

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



PRESENCIA DE CÉLULAS TRONCALES MENSENQUIMALES EN  
MÉDULA ÓSEA: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE CRESTA ILÍACA,  
METÁFISIS DISTAL DE FÉMUR Y METÁFISIS PROXIMAL DE TIBIA

TESIS DOCTORAL DE:

**FRANCISCO JAVIER NARBONA CÁRCELES**

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

**FRANCISCO JAVIER VAQUERO MARTÍN  
MARÍA EUGENIA FERNÁNDEZ SANTOS**

Madrid, 2013

# TESIS DOCTORAL

## **PRESENCIA DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES EN MÉDULA ÓSEA. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE CRESTA ILÍACA, METÁFISIS DISTAL DE FÉMUR Y METÁFISIS PROXIMAL DE TIBIA.**

TRABAJO PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR REALIZADO POR

**Francisco Javier Narbona Cárceles**

Directores:

**Francisco Javier Vaquero Martín**

**María Eugenia Fernández Santos**



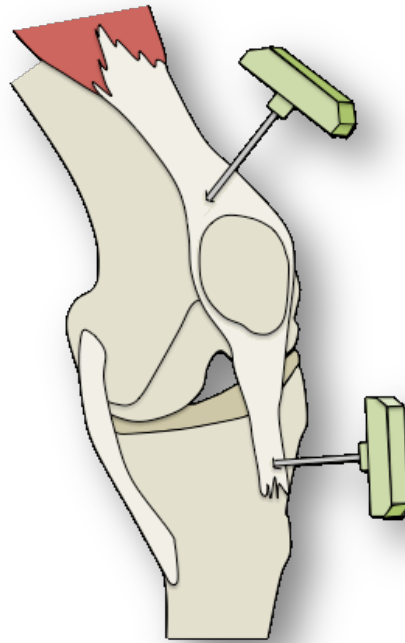
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, FACULTAD DE MEDICINA,

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

Diciembre de 2012



**PRESENCIA DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES EN MÉDULA  
ÓSEA. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE CRESTA ILÍACA, METÁFISIS  
DISTAL DE FÉMUR Y METÁFISIS PROXIMAL DE TIBIA.**



TRABAJO PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR REALIZADO POR

**Francisco Javier Narbona Cárceles**

Directores:

**Francisco Javier Vaquero Martín**

**María Eugenia Fernández Santos**

Diciembre de 2012





Don Javier Vaquero Martín, Profesor Titular de Cirugía Ortopédica y Traumatología de la Universidad Complutense de Madrid, y Jefe del Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid

**CERTIFICA:**

Que el presente trabajo titulado, **Presencia de células troncales mesenquimales en médula ósea. Estudio comparativo entre cresta ilíaca, metáfisis distal de fémur y metáfisis proximal de tibia**, realizado bajo mi dirección por el licenciado Don Francisco Javier Narbona Cárceles, reúne todos los requisitos científicos y formales para proceder a su lectura y defensa como Tesis Doctoral, para optar al grado de Doctor en Medicina.

Y para que conste a todos los efectos oportunos, y a petición del interesado, firmo el presente certificado en Madrid, a 17 de Diciembre de 2012.



Fdo.: Prof. Javier Vaquero Martín




Doña María Eugenia Fernández Santos, directora del Departamento de Producción Celular del Instituto para la Investigación Biomédica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid

**CERTIFICA:**

Que el presente trabajo titulado, **Presencia de células troncales mesenquimales en médula ósea. Estudio comparativo entre cresta ilíaca, metáfisis distal de fémur y metáfisis proximal de tibia**, realizado bajo mi dirección por el licenciado Don Francisco Javier Narbona Cárceles, reúne todos los requisitos científicos y formales para proceder a su lectura y defensa como Tesis Doctoral, para optar al grado de Doctor en Medicina.

Y para que conste a todos los efectos oportunos, y a petición del interesado, firmo el presente certificado en Madrid, a 17 de Diciembre de 2012.



Fdo.: Dra. María Eugenia Fernández Santos



## AGRADECIMIENTOS

- A Javier Vaquero Martín, por haberme dado la idea, por su paciencia y trabajo en la dirección de esta tesis, por su entusiasmo contagioso que ha hecho que creyera que esto era posible.
- A María Eugenia Fernández Santos, por la dirección de esta tesis, por sus pacientes e incontables explicaciones y sus horas en el laboratorio.
- A Antonio Pérez-Caballer, por haber confiado en mí, por haberme dado tiempo y ánimos para seguir escribiendo.
- A Susana, por su ayuda con la creación de la base de datos y el análisis de las muestras.
- A Pilar, Virginia y Judith, por el procesamiento y análisis de las muestras en laboratorio.
- A Jose María Bellón, por el análisis estadístico de los casos y su ayuda en la interpretación de los datos.
- A Fundación Mapfre, por la concesión de la Beca de “Ayudas para la investigación” para el desarrollo de este trabajo.
- A los pacientes que dieron su consentimiento para la participación en el estudio, gracias.



*DEDICATORIA*

*A mis padres, Juan y Conchita, por su ejemplo y cariño.*

*A mis hermanos, que se me han adelantado.*

*A mis tíos, por su apoyo en la distancia.*

*A Laura, por su cariño, apoyo y paciencia continuas durante todo este tiempo.*

*A Amaya, que en esta ocasión no ha podido acompañarme...*





# ÍNDICE DE CONTENIDOS

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN.....   | 1  |
| 1.1 BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES .....                    | 2  |
| 1.2 HISTORIA DE LAS CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES.....                     | 7  |
| 1.3 CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS TRONCALES<br>MESENQUIMALES.....           | 12 |
| 1.3.1 CRITERIOS MÍNIMOS PARA LA DEFINICIÓN DE CTM .....                      | 12 |
| 1.3.2 MULTIPOTENCIALIDAD Y OTRAS PROPIEDADES DE LAS CTM                      | 15 |
| Diferenciación hacia hueso.....  | 15 |
| Diferenciación hacia grasa.....  | 17 |
| Diferenciación hacia cartílago.....  | 17 |
| Plasticidad de las CTM .....   | 19 |
| Capacidad inmunorreguladora.....   | 25 |
| Homing.....  | 27 |
| Transformación espontánea de las CTM.....                                    | 28 |
| Efectos de la edad y factores externos sobre las CTM .....                   | 28 |
| 1.4 FUENTES PARA LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS TRONCALES<br>MESENQUIMALES.....     | 31 |
| 1.5 MÉTODOS PARA EL AISLAMIENTO, CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE<br>LAS CTM..... | 33 |
| Métodos de aislamiento de CTM procedentes de médula ósea:.....               | 33 |
| Medios de cultivo .....  | 35 |
| Caracterización de las CTM.....  | 37 |
| Inducción de la diferenciación hacia grasa, hueso y cartílago.....           | 39 |

|  |     |
|--|-----|
| 1.6 USOS TERAPÉUTICOS DE LAS CÉLULAS TRONCALES                       |     |
| MESENQUIMALES.....   | 40  |
| Aplicaciones en enfermedades cardiovasculares.....                   | 41  |
| Aplicaciones en sistema nervioso central .....                       | 42  |
| Aplicaciones en enfermedades hepáticas .....                         | 43  |
| Aplicaciones en enfermedades gastrointestinales.....                 | 44  |
| Aplicaciones en transplantes .....                                   | 44  |
| Aplicaciones en cirugía ortopédica y traumatología .....             | 46  |
| 2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DEL ESTUDIO .....                       | 55  |
| 2.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO .....                                       | 61  |
| 2.2 OBJETIVOS DEL ESTUDIO .....                                      | 63  |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS .....  | 65  |
| 3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO .....   | 66  |
| 3.2 SELECCIÓN DE PACIENTES .....                                     | 68  |
| 3.3 TÉCNICA DE OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS .....                       | 70  |
| 3.3.1 Técnica de aspirado medular. ....                              | 70  |
| 3.4 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS EN LABORATORIO.....                | 77  |
| 3.4.1 Aislamiento y expansión de las CTM de médula ósea.....         | 78  |
| 3.4.2 Caracterización de las CTM. Inmunofenotipo. ....               | 90  |
| 3.4.3 Diferenciación de las CTM hacia grasa, hueso y cartílago ..... | 95  |
| 3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....                                       | 99  |
| 3.5.1 Variables de medición .....                                    | 99  |
| 3.5.2 Estadística descriptiva.....                                   | 100 |
| 3.5.3 Estadística inferencial.....                                   | 100 |
| 4. RESULTADOS .....  | 103 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.1 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA.....  | 106 |
| 4.1.1 Datos demográficos de la muestra .....  | 106 |
| 4.1.2 Estadísticos descriptivos de las muestras procedentes de cresta<br>ilíaca ..... | 107 |
| 4.1.3 Estadísticos descriptivos de metáfisis distal de fémur .....                    | 110 |
| 4.1.4 Estadísticos descriptivos de metáfisis proximal de tibia.....                   | 113 |
| 4.1.5 Estadísticos descriptivos del análisis inmunofenotípico .....                   | 117 |
| 4.1.6 Análisis citométrico de la médula ósea. ....                                    | 119 |
| 4.1.7 Análisis citométrico de las CMN .....   | 120 |
| 4.1.8 Análisis citométrico de las CTM .....   | 122 |
| 4.2 ESTADÍSTICA INFERENCIAL.....  | 126 |
| 4.2.1 Análisis comparativo de la celularidad entre cresta ilíaca y fémur: .           | 126 |
| 4.2.2 Análisis comparativo de la celularidad entre cresta ilíaca y tibia:....         | 128 |
| 4.2.3 Análisis comparativo de la celularidad entre fémur y tibia:.....                | 130 |
| 4.2.4 Análisis comparativo del fenotipo entre cresta y fémur: .....                   | 131 |
| 4.2.5 Análisis comparativo del fenotipo entre cresta y tibia:.....                    | 133 |
| 4.2.6 Correlaciones no paramétricas (Rho de Spearman) .....                           | 135 |
| 4.3 DIFERENCIACIÓN HACIA HUESO, GRASA Y CARTÍLAGO .....                               | 137 |
| 5. DISCUSIÓN .....  | 143 |
| 5.1 Motivo del estudio .....  | 144 |
| 5.2 Análisis de los resultados.....   | 149 |
| 5.3 Relevancia clínica .....  | 158 |
| 5.4 Limitaciones del estudio.....   | 159 |
| 6. CONCLUSIONES .....   | 161 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA.....  | 163 |

|  |     |
|--|-----|
| 8. ANEXOS.....   | 175 |
| 8.1 DOCUMENTO ACREDITATIVO DE APROBACIÓN DEL COMITÉ ÉTICO<br>DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA..... | 176 |
| 8.2 MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA<br>PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO.....            | 177 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |            |
|---|------------|
| <i>Figura 1. Células troncales embrionarias. ....</i>   | <i>3</i>   |
| <i>Figura 2. Tipos de células troncales somáticas. ....</i>   | <i>5</i>   |
| <i>Figura. 3. Doctores Alexander Friedenstein y Maureen Owen. ....</i>                                  | <i>8</i>   |
| <i>Figura 4. Trócar canulado para punción aspiración de médula ósea BMA<br/>System (Synthes®). ....</i> | <i>71</i>  |
| <i>Figura 5. Esquema de punción de cresta ilíaca. ....</i>  | <i>72</i>  |
| <i>Figura 6. Esquema de punciones para metáfisis distal de fémur y proximal de<br/>tibia. ....</i>      | <i>74</i>  |
| <i>Figura 7. Ejemplo de punción de metáfisis distal de fémur. ....</i>                                  | <i>75</i>  |
| <i>Figura 8. Ejemplo de punción de metáfisis proximal de tibia. ....</i>                                | <i>76</i>  |
| <i>Figura 9. Instalaciones del Laboratorio de Terapia Celular del HGUGM. ....</i>                       | <i>77</i>  |
| <i>Figura 10. Sala blanca del laboratorio de Terapia Celular del HGUGM. ....</i>                        | <i>78</i>  |
| <i>Figura 11. Filtrado de las muestras a través de filtro de 200 µm. ....</i>                           | <i>79</i>  |
| <i>Figura 12. Separación por gradiente de densidad por Ficoll. ....</i>                                 | <i>81</i>  |
| <i>Figura 13. Centrifugación a 400G (1200 r.p.m) durante 30 minutos a 22°C. ...</i>                     | <i>81</i>  |
| <i>Figura 14. Muestra tras la centrifugación. ....</i>  | <i>82</i>  |
| <i>Figura 15. Cámara de Neubauer. ....</i>  | <i>84</i>  |
| <i>Figura 16. Frasco de cultivo con DMEM. ....</i>  | <i>86</i>  |
| <i>Figura 17. Incubación de los cultivos. ....</i>  | <i>87</i>  |
| <i>Figura 18. Cultivo de CTM visualizado en microscopio invertido.....</i>                              | <i>88</i>  |
| <i>Figura 19. Visualización en microscopio invertido. ....</i>  | <i>89</i>  |
| <i>Figura 20. Calibración de la citometría. ....</i>  | <i>94</i>  |
| <i>Figura 21. Sobrenadante de grasa presente en una muestra de médula ósea<br/>de tibia. ....</i>       | <i>105</i> |

|  |            |
|--|------------|
| <i>Figura 22. Diferenciación osteogénica (X10 aumentos), CTM cresta paciente</i>   |            |
| <i>nº18. ....</i>  | <i>138</i> |
| <i>Figura 23. Diferenciación osteogénica (X10 aumentos), CTM fémur paciente</i>    |            |
| <i>nº10. ....</i>  | <i>138</i> |
| <i>Figura 24. Diferenciación osteogénica (X20 aumentos), CTM tibia paciente</i>    |            |
| <i>nº10. ....</i>  | <i>139</i> |
| <i>Figura 25. Diferenciación adipogénica (X10 aumentos), CTM cresta, paciente</i>  |            |
| <i>nº18. ....</i>  | <i>139</i> |
| <i>Figura 26. Diferenciación adipogénica (X10 aumentos), CTM fémur, paciente</i>   |            |
| <i>nº10. ....</i>  | <i>140</i> |
| <i>Figura 27. Diferenciación adipogénica (X40 aumentos), CTM tibia paciente</i>    |            |
| <i>nº10. ....</i>  | <i>140</i> |
| <i>Figura 28. Diferenciación condrogénica (X10 aumentos), CTM cresta, paciente</i> |            |
| <i>nº18. ....</i>  | <i>141</i> |
| <i>Figura 29. Diferenciación condrogénica (X10 aumentos), CTM fémur, paciente</i>  |            |
| <i>nº10. ....</i>  | <i>141</i> |
| <i>Figura 30. Diferenciación condrogénica (X20 aumentos), CTM tibia, paciente</i>  |            |
| <i>nº10. ....</i>  | <i>142</i> |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |            |
|--|------------|
| <i>Tabla 1. Resumen de los criterios mínimos para la identificación de CTM.....</i>  | <i>14</i>  |
| <i>Tabla 2. Descripción de los marcadores empleados en la citometría para caracterización de CTM. ....</i>                               | <i>92</i>  |
| <i>Tabla 3. Disposición de los anticuerpos fluorocromos en los diferentes tubos de ensayo para la citometría de cuatro colores. ....</i> | <i>93</i>  |
| <i>Tabla 4. Datos demográficos de la muestra. ....</i>   | <i>106</i> |
| <i>Tabla 5. Análisis descriptivo de la edad de la población de estudio. ....</i>   | <i>107</i> |
| <i>Tabla 6. Estadísticos descriptivos de las muestras procedentes de médula ósea de cresta ilíaca ....</i>                               | <i>107</i> |
| <i>Tabla 7. Éxito de los cultivos de cresta ilíaca. ....</i>   | <i>109</i> |
| <i>Tabla 8. Estadísticos descriptivos de metáfisis distal de fémur ....</i>  | <i>110</i> |
| <i>Tabla 9. Éxito de los cultivos de metáfisis distal de fémur. ....</i>   | <i>112</i> |
| <i>Tabla 10. Estadísticos descriptivos de metáfisis proximal de tibia. ....</i>  | <i>113</i> |
| <i>Tabla 11. Éxito de los cultivos de metáfisis proximal de tibia. ....</i>  | <i>115</i> |
| <i>Tabla 12. Citometría para las células presentes en médula ósea de cresta ilíaca. ....</i>   | <i>119</i> |
| <i>Tabla 13. Citometría para las células presentes en médula ósea de fémur. ...</i>  | <i>119</i> |
| <i>Tabla 14. Citometría para las células presentes en médula ósea de tibia. ....</i>   | <i>119</i> |
| <i>Tabla 15. Citometría para las CMN obtenidas a partir de médula ósea de cresta ilíaca. ....</i>  | <i>120</i> |
| <i>Tabla 16. Citometría para las CMN obtenidas a partir de médula ósea de fémur. ....</i>  | <i>120</i> |



|   |         |
|---|---------|
| <i>Tabla 17. Citometría para las CMN obtenidas a partir de médula ósea de tibia.</i>      |         |
| .....   | 121     |
| <i>Tabla 18. Análisis comparativo de la celularidad entre cresta ilíaca y fémur.</i>      |         |
| <i>Test de Wilcoxon.</i> .....  | 126     |
| <i>Tabla 19. Análisis comparativo de la celularidad entre cresta ilíaca y tibia. Test</i> |         |
| <i>de Wilcoxon.</i> .....   | 128     |
| <i>Tabla 20. Análisis comparativo de la celularidad entre fémur y tibia. Test de</i>      |         |
| <i>Wilcoxon.</i> .....  | 130     |
| <i>Tabla 21. Análisis comparativo del fenotipo entre cresta ilíaca y fémur. Test de</i>   |         |
| <i>Wilcoxon.</i> .....  | 131-132 |
| <i>Tabla 22. Análisis comparativo del fenotipo entre cresta ilíaca y tibia. Test de</i>   |         |
| <i>Wilcoxon.</i> .....  | 133-134 |
| <i>Tabla 23. Correlación entre concentración de las CMN, viabilidad CMN, éxito</i>        |         |
| <i>de los cultivos y edad para cresta ilíaca. (Rho de Spearman).</i> .....                | 135     |
| <i>Tabla 24. Correlación entre concentración de las CMN, viabilidad CMN, éxito</i>        |         |
| <i>de los cultivos y edad para fémur. (Rho de Spearman).</i> .....                        | 135     |
| <i>Tabla 25. Correlación entre concentración de las CMN, viabilidad CMN, éxito</i>        |         |
| <i>de los cultivos y edad para tibia. (Rho de Spearman).</i> .....                        | 136     |

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

|  |            |
|--|------------|
| <i>Gráfico 1. Diagrama de cajas representando la concentración de CMN para cresta ilíaca, fémur distal y tibia proximal. ....</i>                          | <i>115</i> |
| <i>Gráfico 2 Diagrama de cajas representando el nº final de CTM obtenidas al final del cultivo para cresta ilíaca, fémur distal y tibia proximal. ....</i> | <i>116</i> |
| <i>Gráfico 3. Ejemplo de citometría de control de autofluorescencia para CTM de cresta ilíaca, paciente nº19. ....</i>                                     | <i>123</i> |
| <i>Gráfico 4. Ejemplo de citometría de las CTM de cresta ilíaca, paciente nº19. ....</i>   | <i>123</i> |
| <i>Gráfico 5. Ejemplo de citometría de control de autofluorescencia para CTM de metáfisis distal de fémur, paciente nº19. ....</i>                         | <i>124</i> |
| <i>Gráfico 6. Ejemplo de citometría de las CTM de metáfisis distal de fémur, paciente nº19. ....</i>   | <i>124</i> |
| <i>Gráfico 7. Ejemplo de citometría de control de autofluorescencia para CTM de metáfisis proximal de tibia, paciente nº19. ....</i>                       | <i>125</i> |
| <i>Gráfico 8. Ejemplo de citometría de las CTM de metáfisis proximal de tibia, paciente nº19. ....</i>   | <i>125</i> |



## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ACI: (*del inglés*) implante de condrocitos autólogos.

APC: alofococianina.

BMP: (*del inglés*) proteína morfogenética del hueso.

CD: clúster de diferenciación.

CFU: (*del inglés*) unidad formadora de colonias.

CFU-F: (*del inglés*) fibroblasto-unidad formadora de colonias.

Cls: células

CM: células mononucleadas (en las tablas de análisis estadístico).

CMN: células mononucleadas.

CTE: células troncales embrionarias.

CTM: célula troncal mesenquimal.

CTS: célula troncal somática.

DMEM: (*del inglés*) medio de Eagle modificado por Dulbecco.

DMSO: dimetilsulfóxido.

EIAS: espina ilíaca anterosuperior.

EICH: enfermedad de injerto contra huésped.

FBS: (*del inglés*) suero bovino fetal.

FITC: fluoresceína isotiocianato.

GMP: (*del inglés*) normas de buena manufactura.

HGF: (*del inglés*) factor de crecimiento de hepatocitos.

HGUGM: Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

HLA: (*del inglés*) antígeno leucocitario humano.

IBMX: 3-isobutil 1-metilxantina.

ICAM: (*del inglés*) molécula de adhesión intercelular.

IDO: indolamina 2-3 dioxigenasa.

IFN: interferón.

IGF: (*del inglés*) factor de crecimiento insulínico.

IL: interleucina.

ISCT: (*del inglés*) sociedad internacional de terapia celular.

MHC: (*del inglés*) complejo mayor de histocompatibilidad.

MO: médula ósea.

PBS: (*del inglés*) solución salina tamponada con fosfato, búfer fosfato.

PE: ficoeritrina.

PerCP: peridina clorofila.

PG: prostaglandina.

PTR: prótesis total de rodilla.

RIA: (*del inglés*) fresado, irrigado y aspirado.

RMN: resonancia magnética nuclear.

RNA: ácido ribonucleico.

RPM: revoluciones por minuto.

SSC: (*del inglés*) dispersión lateral (*Side SCatter*).

ST: sangre total (en las tablas de análisis estadístico).

TGF: (*del inglés*) factor de crecimiento tumoral.

VCAM: (*del inglés*) molécula de adhesión vascular

VEGF: (*del inglés*) factor de crecimiento vascular endotelial.

## 1. INTRODUCCIÓN

## **1.1 BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES**

Las células troncales son un tipo de células presentes en el organismo con una especial capacidad de autorreplicación, proliferación y diferenciación hacia células de otros tejidos (Phinney DG et al. 2007).

Éstas células se distinguen por una serie de características fundamentales. Son capaces de renovarse a sí mismas por medio de división celular incluso después de períodos largos de inactividad. Esta capacidad clonogénica se mantiene por largos períodos de tiempo dependiendo del tipo específico de célula troncal. Otra característica fundamental es que bajo determinadas condiciones fisiológicas o experimentales pueden diferenciarse hacia células de tejidos u órganos con funciones específicas.

Cuando una célula troncal se divide, lo hace de forma asimétrica, es decir, da una célula troncal genéticamente similar a la inicial (clonogenicidad) y otra célula con una función más especializada dependiendo del tejido donde se encuentre. Éste último proceso se conoce como “diferenciación”.

Éstas características les confieren la capacidad de mantener o reparar los diferentes tejidos y órganos en los que se encuentran (Barry FP 2003).

Dependiendo de su procedencia las células troncales se dividen en células troncales embrionarias (CTE) o células troncales somáticas (CTS).

Las células troncales embrionarias son células pluripotentes procedentes de embriones en fases tempranas del desarrollo (Figura 1). Las células troncales somáticas, también llamadas células troncales del adulto, son células presentes en diferentes tejidos del organismo y presentan capacidad multipotente (Figura 2). El término multipotente indica la capacidad de éstas células para dar lugar sólo a unos determinados tipos de células de diferentes tejidos, generalmente limitados a los derivados de la capa embrionaria de la que proceden o los tipos celulares presentes en el órgano en que se encuentran. En cambio, el término pluripotencia hace referencia a la capacidad para dar lugar a todos los diferentes tipos celulares del organismo.

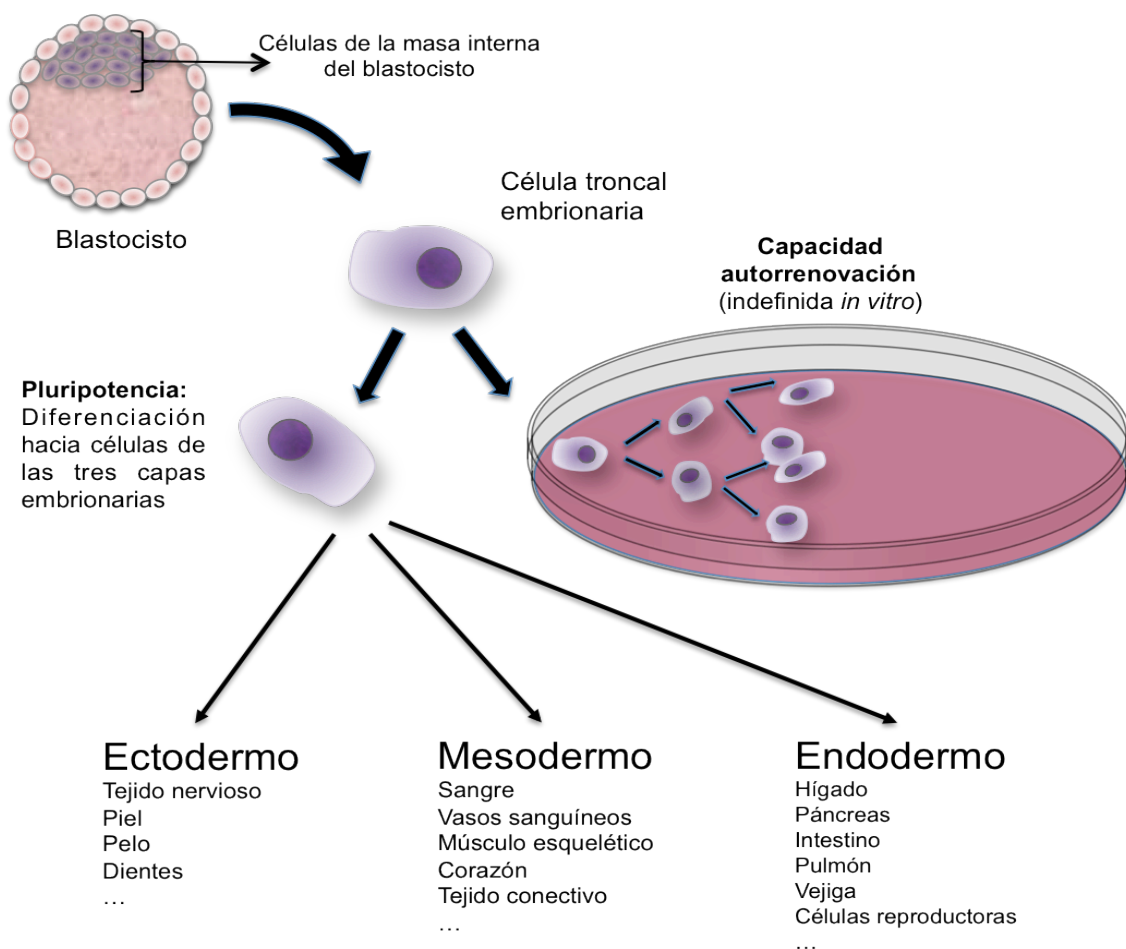


Figura 1. Células troncales embrionarias. Éstas células son pluripotenciales y pueden dar lugar a tejidos pertenecientes a cualquiera de las tres capas embrionarias.



Diversos estudios han demostrado la presencia de células troncales somáticas en diferentes tejidos del organismo humano; Médula ósea, grasa, hueso, cartílago, intestino, hígado, corazón, músculo, páncreas, tejido neural, pulpa dental, piel, gónadas, pared de vasos sanguíneos, sangre, placenta y cordón umbilical entre otros (Young HE et al. 2001).

Se han descrito en diferentes estudios varios tipos de CTS aunque las más estudiadas han sido las células troncales hematopoyéticas, presentes en la médula ósea y que dan lugar a todos los tipos celulares presentes en la sangre. La biología y mecanismo de acción de éstas células ha sido ampliamente descrito, por lo que en las últimas décadas los investigadores han comenzado a centrar sus estudios sobre otros tipos de CTS como por ejemplo las células troncales mesenquimales, intestinales, y neurales entre otras (Flores-Figueroa 2006).

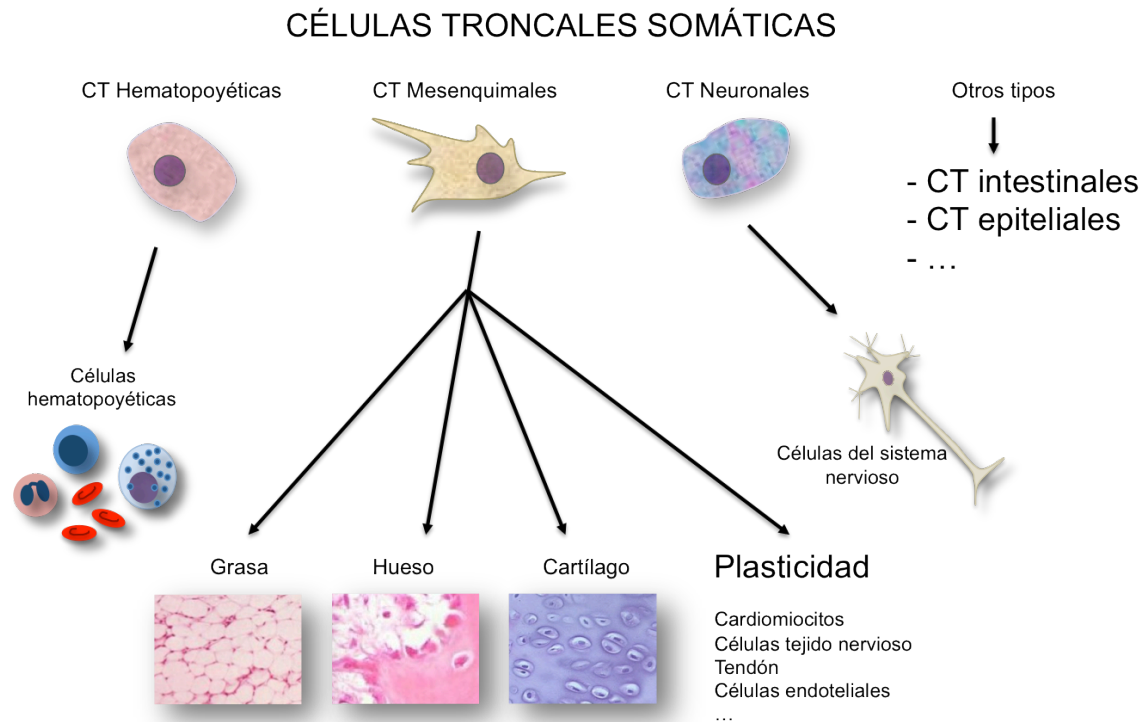


Figura 2. Tipos de células troncales somáticas.

De los tipos celulares previamente descritos las células troncales mesenquimales (CTM) son las que han generado un mayor interés entre los investigadores por su gran plasticidad y facilidad de obtención, lo que les otorga un enorme potencial para uso terapéutico.

Las CTM son un tipo de células troncales somáticas presentes en el estroma de diferentes tejidos del organismo, aunque se encuentran predominantemente en el estroma de la médula ósea. El gran interés que existe por estas células proviene de su capacidad para diferenciarse hacia tejidos como grasa y tejido conectivo, tejidos del sistema musculoesquelético como hueso, cartílago y tendón, y recientemente se ha demostrado su gran plasticidad al observar capacidad incluso para diferenciarse hacia células de músculo liso, cardiomiocitos e incluso tejido neural (Herzog EL et al. 2003). La plasticidad

celular se define como la capacidad de una célula para diferenciarse a tipos celulares diferentes de su tejido de origen, o incluso de una capa embrionaria diferente. Así mismo éstas células presentan efectos locales regulando el microambiente que las rodea mediante efectos paracrinos e incluso inmunomoduladores. Éstas propiedades les otorgan un gran valor como alternativa al uso de las células troncales embrionarias.

## 1.2 HISTORIA DE LAS CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES

En 1968 un investigador ruso llamado Alexander Friedenstein y sus colaboradores describieron el hallazgo de un tipo de células adherentes al plástico con alta capacidad replicativa y capacidad para formar colonias de fibroblastos *in vitro* presentes en el estroma de médula ósea de ratones y cobayas (Friedenstein AJ et al. 1968). Friedenstein describió que tras la siembra de una muestra de médula ósea al eliminar las células en suspensión quedaba una serie heterogénea de células adheridas al plástico. Dichas células tras ser cultivadas se replicaban generando colonias de células con un aspecto similar a los fibroblastos del tejido conectivo. Denominaron a este tipo de células “Unidades formadoras de colonias de fibroblastos” (CFU-F, del inglés “colony former units – fibroblasts”). Encontraron posteriormente que éstas colonias de fibroblastos al ser trasplantadas *in vivo* en cobayas podían generar osteoblastos, por lo que en dicho estudio postulaban la posibilidad de que dichas células fueran las responsables de generar el soporte estromal necesario para albergar el tejido hematopoyético (Friedenstein AJ et al. 1974).

En 1980, Owen y Ashton demostraron que estas colonias de fibroblastos eran capaces de generar hueso, cartílago y tejido conectivo en un estudio *in vivo* al ser implantadas en cámaras de difusión en peritoneo de conejos (Ashton BA et al. 1980). En su estudio describieron estos hallazgos sin poder determinar si la creación de estos tejidos era debido a un único tipo de célula o varios.



*Figura 3. Doctores Alexander Friedenstein (1924–1998) y Maureen Owen (1927-2011), pioneros en la investigación con células troncales mesenquimales.*

En un estudio posterior realizado nuevamente por Friedenstein y sus colaboradores se demostró que dichas colonias de fibroblastos procedían de un único tipo de célula, y que ésta presentaba una gran capacidad replicativa *in vitro*. Afirmaron que un único tipo de célula era la responsable de la formación de colonias de fibroblastos y que por tanto también sería la responsable de generar hueso, cartílago y tejido conjuntivo (Friedenstein AJ et al. 1987).

Finalmente fue en 1988 cuando en un estudio conjunto, Owen y Friedenstein propusieron por primera vez la posibilidad de la existencia de una célula troncal en el estroma de la médula ósea diferente a las ya conocidas células troncales hematopoyéticas (Owen M et al. 1988). El término que emplearon para denominarla fue “célula troncal estromal”.

Caplan fue el primero en acuñar el término “célula troncal mesenquimal” en la década de los 90. Fue uno de los primeros autores en conseguir cultivar y transplantar éstas células en humanos y observar la formación de hueso producida por éstas células mediante un método para la obtención y cultivo

diferente a los empleados hasta entonces (Caplan AI 1994). Introdujo una mejora para la obtención de una muestra más pura de células mononucleadas de la médula ósea mediante centrifugación por gradiente de densidad utilizando Percoll.

Desde entonces la investigación de las células troncales mesenquimales en humanos ha ido cobrando un gran auge. Mediante el empleo de técnicas más sofisticadas se ha demostrado que éstas células presentan un potencial y una plasticidad mucho mayor de lo que se pensaba en un inicio.

La capacidad para diferenciación hacia tejido adiposo, cartílago y hueso es una de las características fundamentales que define a éstas células. Dicha propiedad fue demostrada por primera vez en 1999 en los estudios publicados por Pittenger y colaboradores (Pittenger MF et al. 1999).

La plasticidad de las CTM ha sido estudiada en las últimas dos décadas. Wakitani demostró capacidad para diferenciación hacia células musculares en modelo animal (Wakitani S et al. 1995). Sánchez Ramos en el año 2000 demostró en humanos diferenciación de éstas CTM hacia células del tejido nervioso (Sanchez-Ramos J et al. 2000), y Oswald diferenciación hacia células endoteliales (Oswald J et al. 2004).

Desde el descubrimiento de las CTM se ha realizado un gran esfuerzo por encontrar moléculas expresadas por éstas células que permitan identificarlas y diferenciarlas del resto de los linajes celulares. Hebertson propuso la expresión

de fosfatasa alcalina como marcador (Herbertson A et al. 1997), ya que en sus ensayos observó en poblaciones de médula ósea con alta concentración de progenitores osteogénicos la expresión de ésta molécula. Sin embargo en estudios posteriores se observó que las CTM no expresan esta molécula en su estado indiferenciado a no ser que sean inducidas a la diferenciación hacia osteoblastos (Mackay AM et al. 1998).

En 1991, Simmons describió el marcador STRO-1, que es un anticuerpo que reconoce las células estromales de la médula ósea (Simmons PJ et al. 1991). Lamentablemente no todas las CTM expresan dicho marcador y además es también expresado por las células eritroides.

Caplan y Haynesworth describieron en 1992 tres anticuerpos que reconocían antígenos de membrana en las CTM sin reaccionar con las células hematopoyéticas o las células diferenciadas de hueso o cartílago (Haynesworth SE et al. 1992). Denominaron a estos marcadores con el nombre de las líneas celulares en que realizaron sus investigaciones, SH2, SH3 y SH4. El anticuerpo SH2 reconoce a la molécula CD105 (Endoglin), y SH3 y SH4 al antígeno de membrana CD73 (Javazon EH et al. 2004). Este estudio supuso un gran avance en la identificación de las CTM, hasta el punto de que éstos marcadores son considerados un requisito actual en la identificación de las CTM.

Diversos estudios posteriores coinciden en que las CTM no presentan los marcadores de membrana expresados por las células hematopoyéticas y sus

precursoras exceptuando el marcador CD90 que es compartido con éstas. Lamentablemente, pese a que se han detectado múltiples moléculas expresadas por éstas células hasta la fecha no se ha encontrado ninguna que esté presente únicamente en las CTM, por lo que la búsqueda continúa.

Los métodos para el cultivo de éstas células, así como los criterios que se han empleado para definirlas, han ido variando en el tiempo conforme los estudios de diferentes autores han ido arrojando nuevos datos. Dada la gran variabilidad de técnicas de estudio empleadas y la imposibilidad de encontrar un marcador específico de éstas células que pueda distinguirlas de las demás se observó la necesidad de establecer unos parámetros estandarizados de manera consensuada para la identificación de éstas células.

De esta manera, en el año 2006 la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) anunció en una publicación la definición y requisitos mínimos que debe cumplir una célula para poder ser considerada célula troncal mesenquimal (Dominici M et al. 2006). Estos requisitos consisten en la capacidad para adherencia al plástico, la expresión de CD90, CD105 y CD73, la ausencia de antígeno humano de histocompatibilidad (HLA-DR) y marcadores de células hematopoyéticas (Exceptuando CD90), y la capacidad de diferenciación hacia grasa, hueso y cartílago.

Los criterios mencionados son los empleados actualmente por los investigadores en este campo. Los estudios para encontrar un marcador presente únicamente en las CTM continúa hoy día.



## **1.3 CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES**

### ***1.3.1 CRITERIOS MÍNIMOS PARA LA DEFINICIÓN DE CTM***

Como ya ha sido mencionado previamente la Sociedad Internacional de Terapia Celular estableció en una reciente publicación los requisitos mínimos que debe presentar una célula para poder ser considerada como CTM (Dominici M et al. 2006).

El primer requisito es que éstas células deben presentar adherencia al plástico. Al cultivar células mononucleadas obtenidas de médula ósea en un frasco de cultivo, se observa cómo pasados unos días algunas células quedan adheridas al plástico mientras que la mayoría se mantienen en suspensión en el medio de cultivo. La capacidad de adherencia no es exclusiva de las CTM sino que es compartida por varios tipos celulares entre los que se encuentran macrófagos, fibroblastos y otros tipos de células diferenciadas. A la visualización al microscopio las células en suspensión presentan una morfología esférica, mientras que las células adheridas se aplanan adoptando un patrón fusiforme con expansiones semejantes a las observadas en los fibroblastos.

Cuando se realiza un cambio del medio las células en suspensión son eliminadas, mientras que las adheridas permanecen en el frasco de cultivo. Con los sucesivos lavados se observa cómo la muestra se va homogeneizando

a medida que las células adherentes proliferan y van tapizando la superficie del frasco de cultivo.

La segunda característica es un patrón fenotípico que requiere tanto la presencia o ausencia de determinados marcadores específicos. La ISCT establece que las células consideradas CTM deben expresar CD90, CD105 y CD73 (Dominici M et al. 2006).

CD90, también conocido como Thy-1 es un marcador compartido con las células troncales hematopoyéticas, aunque se ha visto que todas las CTM lo expresan. CD105, también llamado Endogлина, es una molécula de adhesión reconocida por el anticuerpo SH2 y es también expresado por las células endoteliales. CD73 (Ecto 5' nucleotidasa), es reconocida por los anticuerpos SH3 y SH4 y es un antígeno también expresado por subpoblaciones de células B y T.

Los tres antígenos de superficie previamente mencionados no son únicos de las CTM ya que son expresados también por otras células. Por tanto, para evitar la identificación errónea de poblaciones heterogéneas de CTM con otras células, la ISCT recomienda comprobar la negatividad de marcadores expresados por las células hematopoyéticas. Los marcadores propuestos son ; CD45, CD34, CD14 ó CD11b, CD79α ó CD19 y HLA-DR.

CD45 es un marcador de leucocitos, CD34 es típico de las células troncales hematopoyéticas (CTH). CD14 y CD11b son expresados por macrófagos y

monocitos, que junto con las células B (CD79α+ y CD19+) son las células que también presentan capacidad de adhesión y mayor presencia junto a las CTM. El antígeno humano de histocompatibilidad (HLA-DR) no se encuentra en las CTM a no ser que sean estimuladas (por ejemplo mediante IFN-γ).

Por tanto, la positividad de marcadores CD90, CD105 y CD73 en las células de un cultivo junto con la carencia de expresión de marcadores hematopoyéticos sugiere una alta posibilidad de que dichas células sean CTM.

| Resumen de los criterios para identificar a las CTM   |                    |                   |
|---|--------------------|-------------------|
| 1. Adherencia al plástico en condiciones estándar de cultivo  |                    |                   |
| 2. Fenotipo:  | Positivo (≥95 % +) | Negativo (≤2 % +) |
|   | CD105              | CD45              |
|   | CD73               | CD34              |
|   | CD90               | CD14 ó CD11b      |
|   |                    | CD79α ó CD19      |
|   |                    | HLA-DR            |
| 3. Diferenciación <i>in vitro</i> a osteoblastos, adipocitos, condroblastos demostrada mediante tinciones específicas |                    |                   |

Tabla 1. Resumen de los criterios mínimos para la identificación de CTM. (Tomado y traducido de Dominici et. al. 2006)

El tercer requisito necesario que representa de una manera más importante la naturaleza de éstas células es el potencial para diferenciación trilineal. Las CTM deben tener la capacidad de diferenciarse hacia adipocitos, osteoblastos y condrocitos, cuando son inducidas a ello en condiciones específicas de cultivo con medios de inducción adecuado. La diferenciación puede ser demostrada mediante visualización al microscopio y tinciones específicas del cultivo *in vitro*.

### 1.3.2 MULTIPOTENCIALIDAD Y OTRAS PROPIEDADES DE LAS CTM

#### Diferenciación hacia hueso

La diferenciación hacia tejido óseo es una capacidad de las CTM que ha sido observada desde los inicios de la investigación sobre éstas células. Descrita inicialmente por Owen se observó que éstas células presentaban capacidad osteogénica cuando eran implantadas en un entorno adecuado (Owen M et al. 1988).

Caplan realizó un experimento en ratas donde extraía y cultivaba células troncales mesenquimales de médula ósea (Caplan AI 1989). Éstas células eran implantadas en bloques de fosfato cálcico poroso y posteriormente introducidas subcutáneamente de nuevo en las ratas. Observaron *in vivo* que éstas células reaccionaban a nivel de los implantes generando tejido óseo sobre los mismos. Así mismo, también observaron que al introducir las células de manera heterotópica, sin otro tipo de soporte, éstas no generaban hueso en ninguno de los casos, por lo que postularon la teoría de que el entorno que rodea a las células induce su diferenciación hacia uno u otro tejido.

Diversos estudios posteriores y otros más recientes han demostrado que las CTM humanas son capaces de generar hueso tanto *in vitro* como *in vivo* cuando se encuentran en un entorno favorable (Park BW et al. 2012).

Jaiswal describió por primera vez una técnica para la inducción *in vitro* de CTM humanas a la diferenciación hacia osteoblastos (Jaiswal N et al. 1997),

basándose ampliamente en los trabajos previos sobre animales realizados por Howlett y otros investigadores (Howlett CR et al. 1986).

Dicha técnica se basa en la adición de Dexametasona,  $\beta$ -glicerolfosfato y Ácido ascórbico al medio de cultivo durante la expansión de las CTM. Éste estudio confirma que la Dexametasona es un potente inductor de la diferenciación osteogénica de las CTM (Jaiswal N et al. 1997).

Se han realizado estudios que analizan diversas moléculas que inducen la actividad osteogénica de éstas células, aunque el método más empleado actualmente por los laboratorios continúa siendo la adición de medios que contienen Dexametasona.

También se ha demostrado que la capacidad de diferenciación osteogénica de las CTM es muy variable, lo que sugiere una heterogenicidad dentro de dicha población celular (Phinney DG et al. 1999). Estudios posteriores demuestran que la interleucina 6 (IL-6) favorece la diferenciación osteogénica (Erices A et al. 2002), pero no todas las CTM expresan receptor para ésta molécula en su superficie, por lo que la heterogeneidad de éstas células es muy probable .

Estudios muy recientes también describen que pulsos electromagnéticos de alta frecuencia inducen la diferenciación de éstas células (Teven CM et al. 2012). La tensión de oxígeno, la carga mecánica, diferentes superficies de implantación y otros factores que influyen en la diferenciación osteogénica de

las CTM son ampliamente estudiados en la actualidad (Lennon DP et al. 2001; Sheehy EJ et al. 2012).

### **Diferenciación hacia grasa**

La diferenciación hacia grasa es una propiedad bien conocida de las CTM. Los estudios realizados se centran en investigar los mecanismos que regulan dicha diferenciación para comprender mejor enfermedades como la obesidad (Sawant A et al. 2012), aunque dado su limitado potencial terapéutico no ha sido estudiada tan extensamente como la diferenciación hacia otros tejidos.

La inducción hacia adipocitos se consigue *in vitro* mediante la creación de un medio con la presencia de Dexametasona, Indometacina y 3-isobutil-1 metilxantina (IBMX) (Qian SW et al. 2010). Otros factores como la alta concentración de glucosa y el alcohol también favorecen la inducción adipogénica (Hernigou P et al. 1997; Huang Q et al. 2010).

### **Diferenciación hacia cartílago**

La diferenciación hacia cartílago ha sido bien demostrada *in vivo* tanto en animales como en humanos. No obstante, el descubrimiento de una técnica para conseguir esta diferenciación *in vitro* ha sido un reto importante para los investigadores.

Las CTM al ser cultivadas en presencia de Dexametasona presentan diferenciación hacia cartílago de un bajo número de las células presentes en el cultivo (Majumdar MK et al. 2000; Lennon DP et al. 2001). El tejido resultante demuestra una pobre calidad, presentando características más propias de fibrocartílago que de cartílago hialino maduro.

Al añadir TGF- $\beta$ 1 (Factor de crecimiento transformante) la tasa de diferenciación aumenta y se observa una mayor presencia de colágeno de tipo II (Johnstone B et al. 1998). Así mismo, la presencia de azúcares simples, BMP-2 (Proteína morfogénica del hueso), ácido retinoico (Vitamina A) y colágeno de tipo I también son factores que promueven la diferenciación condral de las CTM.

Pittenger y colaboradores en 1998 describieron una técnica eficaz para inducir *in vitro* la diferenciación hacia condrocitos de CTM humanas (Mackay AM et al. 1998). Demostraron que la utilización de TGF- $\beta$ 3 presenta mejores resultados que el uso de TGF- $\beta$ 1. Así mismo observaron que el cultivo de las células en medios con suero inhibía la transformación de las células. En su trabajo describen un novedoso método de cultivo tridimensional, realizando microagregados celulares (pellet) mediante centrifugación y cultivándolas en medios exentos de suero y con adición de inductores de la condrogénesis.

En un estudio paralelo realizado en animales por Yoo y colaboradores (Yoo JU et al. 1998) comparan la efectividad del cultivo en monocapa (bidimensional) respecto al cultivo en microagregados (tridimensional) descrito por Pittenger.

Demuestran que aunque ambos métodos producen satisfactoriamente la inducción hacia condrogénesis de las CTM, el método de cultivo tridimensional da lugar a un tejido de cartílago con una estructura más parecida al presente en el organismo vivo. El cultivo en pellet favorece la adherencia y las interacciones célula-célula, por lo que éstos dos fenómenos parecen ser de vital importancia para la consecución de una diferenciación óptima.

Por tanto el cultivo en monocapa es útil en investigación para la caracterización de las CTM con el fin de demostrar su capacidad de diferenciación hacia la estirpe condral, aunque para fines terapéuticos el cultivo tridimensional debería ser el indicado dados los datos previamente mencionados.

Otros factores externos como la aplicación de presión hidrostática cíclica también han demostrado efectos positivos en la inducción de las CTM hacia cartílago (Angele P et al. 2003; Ku CH et al. 2006).

### **Plasticidad de las CTM**

Como previamente se ha mencionado la plasticidad celular se define como la capacidad de una célula para diferenciarse a tipos celulares diferentes de su tejido de origen, o hacia células de una capa embrionaria diferente.

Las CTM presentes en médula ósea proceden del mesodermo, y como tal se ha demostrado su capacidad para dar lugar a diversas células de esta capa



embrionaria como por ejemplo músculo liso, músculo esquelético, músculo cardíaco, tenocitos y células endoteliales.

La plasticidad de estas células ha demostrado ser mayor de la esperada, ya que recientemente se ha demostrado diferenciación hacia células neurales y epiteliales (procedentes del ectodermo) y células de la capa endodérmica como por ejemplo hepatocitos y células pancreáticas (Herzog EL et al. 2003; Tondreau T et al. 2005).

A continuación se indican ejemplos de diferenciación de las CTM a otros tejidos derivados del mesodermo.

#### *Músculo liso*

Kim y colaboradores demostraron que las CTM procedentes de médula ósea en humanos pueden ser inducidas a la formación de células de músculo liso al ser cultivadas en presencia de Tromboxano A2 (Kim MR et al. 2009). En un estudio posterior, esta vez realizado en conejos, Suy colaboradores (Su ZY et al. 2010) demostraron diferenciación hacia músculo liso mediante inducción con Ácido Transretinoico, demostrando que las células obtenidas presentan características morfológicas y genéticas similares a las células de músculo liso, además de contractilidad cuando eran estimuladas con Angiotensina II *in vitro*.

### *Músculo esquelético*

La capacidad de diferenciación de las CTM hacia músculo esquelético se ha demostrado *in vitro* en los estudios realizados por Wakitani (Wakitani S et al. 1995).

El cultivo de CTM en presencia de 5-Azacitidina produce un cambio en la morfología de las células que pasan de tener forma poligonal y un solo núcleo a tener forma fusiforme con dos o varios núcleos.

Esta capacidad también se ha propuesto en diversos estudios realizados *in vivo*. En dichos estudios se observa que tras la implantación de CTM procedentes de médula ósea en tejido muscular dañado, dicho tejido se repara y parte de los miocitos presentan marcadores genéticos que indican su procedencia de las CTM implantadas (Li M et al. 2000; Charge SB et al. 2004). No se sabe con certeza si los mecanismos de reparación son debidos a la generación de miocitos *de novo* a partir de las CTM o si la reparación muscular es producto de la capacidad de dichas células para la angiogénesis y fenómenos paracrinos.

Santa María y colaboradores (Santa Maria L et al. 2004) realizan un estudio en ratas aislando CTM procedentes de médula ósea e incubándolas en medios condicionados obtenidos de cultivos con células musculares sanas y dañadas. El daño muscular se produjo previamente mediante la inyección de una solución de Cloruro de Bario. Observan que las células incubadas en un medio

condicionado proveniente de músculo dañado presentan diferenciación mioblástica, sin necesidad de la adición de otros inductores, a diferencia de las cultivadas en medio proveniente de músculo sano. Esto indica que el músculo dañado produce señales capaces de atraer a la lesión a las células troncales para su reparación y plantea nuevas estrategias moleculares para el futuro.

### *Músculo cardíaco*

El potencial de las CTM procedentes de médula ósea para diferenciarse hacia cardiomiocitos ha generado un enorme interés por su potencial terapéutico.

Dicha propiedad ha sido descrita *in vitro* tanto en humanos (Shim WS et al. 2004) como en animales (Li X et al. 2007). El proceso de inducción incluye el cultivo en presencia de cardiomiocitos maduros y la adición de inductores (5-Azacitidina). Las células muestran contractilidad espontánea *in vitro* y la presencia de morfotipo y proteínas (Bandas “Z”, actinina- $\alpha$  positivas) típicas de las células cardíacas.

*In vivo* se ha demostrado que la administración de CTM en infartos de miocardio mediante la infusión intravenosa o la inyección directa genera fenómenos reparativos en las zonas infartadas (Sanchez PL et al. 2007). Al igual que se ha mencionado previamente respecto al músculo esquelético, no se sabe con certeza si dichos fenómenos reparativos son mediados por la transformación directa de las CTM en cardiomiocitos o por sus fenómenos paracrinos.

## *Tendón*

La diferenciación hacia tendón se ha conseguido *in vitro* mediante el cultivo de CTM de ratas en presencia de tenocitos maduro (Luo Q et al. 2009). También se ha demostrado que el cultivo de éstas células sobre una matriz elástica sometida a estiramiento cíclico (Liao M et al. 2010) produce un cambio morfológico en las mismas, adquiriendo morfología fibroblastoide y la expresión de mRNA para Tenascina C y Scleraxis (Marcadores únicos para tenocitos y células de los ligamentos), así como expresión de altos niveles de mRNA para colágeno de tipo I y III. Así mismo se ha observado que las células adquieren una orientación de unos 65° respecto al eje de estiramiento (Song G et al. 2010).

Un estudio más reciente (Schneider PR et al. 2011) con CTM humanas ha demostrado diferenciación *in vitro* mediante el cocultivo con tenocitos y la inducción mediante IGF-1 y TGF- $\beta$ 1. Es el estudio en humanos con resultados más sólidos.

A continuación se expresan ejemplos de la capacidad para diferenciación hacia tejidos del ectodermo y del endodermo:

## *Tejido nervioso*

La diferenciación neurogénica se ha conseguido *in vivo* en modelos animales de daño neuronal implantando las CTM directamente en una zona previamente

lesionada (Wislet-Gendebien S et al. 2005). Se observan fenómenos reparativos con generación de nuevas células de la glía del tejido nervioso aunque se cree que es debido probablemente a los fenómenos paracrinós de las CTM que inducen la formación de células endógenas y no por diferenciación directa de éstas.

*In vitro* dicha diferenciación ha sido conseguida cultivando las CTM junto a células neuronales de la capa granulosa e inducida por moléculas como antioxidantes, Indometacina, Insulina e Isobutilmetilxantina (Tropel P et al. 2006). Las células diferenciadas muestran proteínas propias de las células neuronales, fundamentalmente la nestina, el marcador NeuN y la presencia de filamentos intermedios. Sin embargo, aunque en estas células se encuentra mRNA propio del linaje neuronal su capacidad funcional no ha podido ser demostrada.

En una reciente publicación, Keum Seok Bae y colaboradores (Bae KS et al. 2011) han demostrado diferenciación hacia tejido nervioso cultivando las CTM únicamente en presencia de factores de crecimiento como EFG (Factor de crecimiento epidérmico), HFG (factor de crecimiento de hepatocitos) y VEGF (Factor de crecimiento vascular endotelial).

### *Hígado y páncreas*

Del mismo modo se ha observado en modelos animales de daño hepático y daño pancreático fenómenos reparativos tras la implantación de CTM

(Mohamadnejad M et al. 2010). *In vitro*, la diferenciación hacia hepatocitos es inducida en presencia de HGF, DMSO (Dimetilsulfóxido) y oncostatina M, o en presencia de HGF, bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos) y nicotinamida (Snykers S et al. 2009; Ayatollahi M et al. 2011). La diferenciación de CTM, procedentes de médula ósea, hacia células  $\beta$  de los islotes pancreáticos ha sido conseguida mediante manipulación genética (transfección) o con cocultivo junto a células  $\beta$ . Además se ha demostrado que las CTM diferenciadas de esta forma responden a estímulos de glucosa secretando insulina (Karnieli O et al. 2007; Zulewski H 2007; Sordi V et al. 2010).

### **Capacidad inmunorreguladora**

Una de las capacidades más sorprendentes de las CTM es su capacidad para escapar al reconocimiento del sistema inmune y que pueden inhibir respuestas inmunitarias.

Diversos estudios indican que el inmunofenotipo de las CTM, la baja expresión de antígeno humano leucocitario (HLA), antígeno humano de histocompatibilidad tipo I (MHC-I) y la ausencia de moléculas coestimuladoras, junto con la observación de que no producen una respuesta proliferativa de linfocitos alogénicos, sugiere la baja inmunogenicidad que presentan las CTM (Barry FP et al. 2005; Rasmusson I 2006).

En un reciente trabajo de revisión realizado por Ghanam y colaboradores (Ghannam S et al. 2010) se resumen los diferentes efectos reguladores que

presentan las CTM sobre las células del sistema inmunitario. Ante todo, el efecto inmunosupresor de las CTM requiere que éstas células sean previamente activadas por las células del sistema inmune por medio de la secreción de la citocina proinflamatoria Interferón gamma (IFN $\gamma$ ). Aunque diversos estudios demuestran que la supresión de la respuesta inmune también se realiza por medio de contacto directo célula-célula, se ha observado que el efecto inmunosupresor de las CTM se realiza fundamentalmente por medio de la secreción de factores solubles externos. Entre estas moléculas las más importantes son la IDO (Indolamina 2,3-Dioxigenasa) que inhibe la formación de productos citotóxicos, y la Prostaglandina E2 (PGE $_2$ ), que actúa inhibiendo la proliferación de células T y su producción de IL-2.

La IL-6 producida por las CTM inhibe la diferenciación de monocitos a células dendríticas (presentadoras de antígenos), y en consecuencia disminuye la estimulación de células T. Asimismo retrasa la apoptosis de Neutrófilos y linfocitos, permitiendo así una mayor cantidad de células disponibles en casos de infección.

Las CTM inhiben la proliferación de linfocitos CD4+, CD8+ ,células B activadas y células NK, tanto en células autólogas como heterólogas. Asimismo promueve el balance de células TH2 (Linfocitos T reguladores), con características antiinflamatorias.

En resumen, las CTM presentan propiedades antiinflamatorias y de inmunosupresión que las hacen idóneas para el tratamiento de diversas

enfermedades. El hecho de que no generen respuesta inmune permite su uso mediante trasplante alogénico (Le Blanc K et al. 2007; Venkataramana NK et al. 2012), así como su uso para la prevención y tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) y enfermedades autoinmunes (Ringden O et al. 2006; Le Blanc K et al. 2008; Arima N et al. 2010).

## Homing

“*Homing*” (del inglés *home*: hogar) hace referencia a la característica de una célula para migrar a un tejido específico. La célula reacciona frente a unas moléculas llamadas quimiocinas moviéndose en un sentido u otro según el gradiente de concentración de éstas moléculas. Este proceso se conoce como quimiotaxis.

Las CTM presentan una variedad de quimiocinas (CCR1, CCR7, CCR9, CXCR4, CXCR5, y CXCR6), receptores quimiotácticos y moléculas de adhesión que les confieren capacidad para ser movilizadas de su tejido de origen y migrar a otros tejidos (Chamberlain G et al. 2007).

Se ha demostrado que las CTM aparecen en tejidos dañados con inflamación. Se ha observado en diferentes estudios que tras infusión intravenosa de CTMs éstas células migran a músculo miocárdico infartado, médula ósea y tejido nervioso dañado (Bensidhoum M et al. 2004; Blocklet D et al. 2006).



## **Transformación espontánea de las CTM**

Existen varias similitudes entre una célula troncal y las células cancerosas. Su capacidad replicativa indefinida y el escape al reconocimiento por el sistema inmune son algunas de estas características.

Rubio D. y colaboradores (Rubio D et al. 2005) describen por primera vez la transformación maligna de CTMs que han sido mantenidas en cultivo por períodos prolongados (4-5 meses). Este hallazgo ha sido igualmente descrito en estudios posteriores (Rosland GV et al. 2009; Ross AL et al. 2011).

Algunos investigadores reportan la aparición o recidiva de neoplasias tras el tratamiento mediante infusión intravenosa de CTMs expandidas en cultivo (Ning H et al. 2008).

Por tanto se recomienda cautela a la hora de emplear estas células en pacientes con enfermedades que requieran una gran cantidad de CTMs y por ello precisen realizar expansión en laboratorio.

## **Efectos de la edad y factores externos sobre las CTM**

Stenderup y colaboradores (Stenderup K et al. 2001) demostraron que el número de CTMs no disminuye con la edad, así como su capacidad replicativa. En un estudio posterior estos mismos investigadores observaron disminución

del período vital y mayor senescencia de las CTM relacionado con la edad (Stenderup K et al. 2003).

Más tarde Hernigou, P. y colaboradores (Hernigou P, Poignard A, Manicom O, et al. 2005) estudiaron las CTM en aspirados de médula ósea de cresta ilíaca obtenidos para el tratamiento de necrosis avascular de fémur. Encontraron que el número de éstas células era menor en pacientes de edad avanzada, pacientes que habían recibido tratamientos prolongados con glucocorticoides y pacientes con problemas de abuso de alcohol. Su conclusión era que estos antecedentes tenían un efecto negativo sobre las CTM disminuyendo su concentración, aunque no su capacidad de diferenciación. Estos resultados son los mismos descritos en el estudio realizado por Garvin y colaboradores (Garvin K et al. 2007).

Las conclusiones de los estudios anteriores difieren entre sí, aunque recientemente, la estandarización de los métodos de cultivo y el mejor conocimiento de la biología de estas células ha hecho posible la realización de estudios que esclarecen mejor esta cuestión.

En un estudio de reciente publicación, Zaim, M. y colaboradores (Zaim M et al. 2012) realizan un análisis de las características de las CTM bajo condiciones de cultivo altamente estandarizadas en tres grupos de edad (niños de 0-12 años, adultos 25-50 años y pacientes mayores de 60 años). Encuentran que el número de CTMs no varía con la edad. La capacidad de diferenciación condrogénica se mantiene constante en las tres edades mientras que la

capacidad para diferenciación adipogénica, osteogénica y neurogénica disminuye con la edad. Encontraron también que la capacidad replicativa disminuye con la edad, presentando mayor senescencia celular con el envejecimiento del organismo. Estos resultados son muy similares a los descritos por Dexheimer y colaboradores (Dexheimer V et al. 2011).

Se ha observado que el abuso de alcohol, la diabetes o el tratamiento crónico con glucocorticoides promueve la diferenciación de las CTM hacia una línea adipocítica en detrimento de la diferenciación osteogénica. Esto puede justificar el hallazgo de conversión grasa de la médula ósea en pacientes con estos antecedentes y, por tanto, la presencia de una menor concentración de CTMs al realizar aspirados de M.O. (Hernigou P et al. 1997).

## 1.4 FUENTES PARA LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES

La fuente más común para la obtención de células troncales mesenquimales es la médula ósea localizada en el hueso esponjoso. Tradicionalmente se ha considerado la médula ósea de cresta ilíaca como la más efectiva para la obtención de CTM. Dicha médula puede ser obtenida mediante biopsia por escisión de un bloque óseo, punción ósea y aspirado o como ha sido descrito más recientemente, mediante fresado intramedular y aspirado simultáneo del material de fresado (Dimitriou R et al. 2011; Kovar FM et al. 2011). Ésta técnica se conoce como RIA (Del inglés; *reamer irrigator aspirator*, fresado con irrigación y aspiración).

En la última década se ha generado una enorme expectativa por el tejido adiposo, dado que diversos estudios han demostrado la presencia de CTM en este tejido con similares características las obtenidas de médula ósea (Zuk PA et al. 2002; Mizuno H 2009). La técnica para la obtención de tejido graso incluye métodos como el lipoaspirado o el empleo de tejidos desechados tras actos quirúrgicos.

Los autores que defienden el uso del tejido graso como fuente para la obtención de CTM frente a aspirado de médula ósea promulgan la facilidad de obtención de las muestras y el alto número de células progenitoras encontradas. Hasta la fecha se han encontrado pequeñas diferencias en el fenotipo, aunque no existen evidencias claras que muestren la superioridad de

una fuente frente a la otra (Strioga M et al. 2012). Actualmente ambos métodos se encuentran bien estandarizados en humanos y cuentan con numerosos estudios que avalan su utilidad en terapia celular.

Otros estudios han mostrado la existencia de CTM a nivel de sangre periférica, sangre y pared de cordón umbilical, hígado, cartílago articular, líquido sinovial, piel, músculo, placenta y líquido amniótico (Young HE et al. 2001; Villaron EM et al. 2004; Tondreau T et al. 2005; McGonagle D et al. 2008; Pretzel D et al. 2011).

En los estudios que reportan estos hallazgos se indica que las características fenotípicas son similares a las CTM procedentes de médula ósea, aunque los métodos para su obtención y procesamiento, por el momento, no están claramente establecidos.

## 1.5 MÉTODOS PARA EL AISLAMIENTO, CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE LAS CTM

Los métodos para el aislamiento, cultivo e identificación de las CTM han sufrido innumerables modificaciones a lo largo del tiempo con el fin de optimizar los resultados obtenidos. El uso, cada vez más frecuente, de células troncales mesenquimales en el tratamiento de diversas enfermedades en humanos ha obligado a estandarizar dichos protocolos para obtener productos de calidad.

Esto se ha visto reflejado en la publicación de unas prácticas de buen procesamiento o GMP (Del inglés *Good Manufacturing Practices*) (Sensebe L et al. 2011). Estas normas establecen unos criterios mínimos de calidad tanto de la obtención de las muestras, su conservación, las instalaciones, protocolos y medios empleados para su procesamiento así como de los controles de calidad que son requeridos para confirmar la naturaleza de dichas células.

### **Métodos de aislamiento de CTM procedentes de médula ósea:**

La médula ósea se obtiene en humanos generalmente mediante punción de la cresta ilíaca con un trocar canulado. Dicho trocar se inserta a nivel del hueso esponjoso y a continuación se realiza aspirado de la médula ósea.

Parece ser que el aspirado de grandes volúmenes produce hemodilución de la muestra. Muschler en su estudio encuentra una optimización de los resultados realizando aspirados de 2 ml cambiando la dirección y profundidad del trocar en cada aspirado (Muschler GF et al. 1997).

Las células troncales mesenquimales se encuentran en la médula ósea en una proporción muy pequeña, con resultados variables, encontrándose aproximadamente en una concentración de una CTM por cada 10.000 a 100.000 células mononucleadas (Brinchmann JE 2008; Jones E et al. 2008; Kasten P et al. 2008; Lubis AM et al. 2011).

Un método para separar esta población de células mononucleadas de la médula ósea es la centrifugación. Con el fin de mejorar la separación de componentes y obtener una muestra más pura se emplea un método de separación por gradiente de densidad, añadiendo un producto que facilita la identificación de las capas de los componentes de la médula ósea tras el centrifugado. El más empleado por los laboratorios es el Ficoll, aunque no ha demostrado superioridad sobre otros productos como el Percoll o el dextrano (Bieback K et al. 2008).

Otro método para la separación consiste en la siembra directa de la muestra de médula ósea en una superficie de plástico, método descrito por Friedenstein en los inicios de la investigación en CTM. Dicho método separa las células troncales hematopoyéticas de las CTM basándose en la propiedad de adherencia al plástico de éstas últimas. Al realizar sucesivos lavados de la muestra se eliminan las células no adheridas y progresivamente también disminuye el número de células hematopoyéticas adherentes.

La adherencia al plástico es fundamental para el cultivo en dos dimensiones de las CTM, ya que se ha observado que cuando ésta adherencia es interrumpida mueren en un período de horas. Éste proceso se conoce como *anoikis*, que es una muerte celular programada fruto de la pérdida de las interacciones célula-célula al ser desancladas de la matriz extracelular (Brinchmann JE 2008). Las CTM presentan *in vivo* una gran interacción con la matriz extracelular y parece ser que cuando son cultivadas *in vitro* utilizan el plástico como sustituto para el anclaje.

### **Medios de cultivo**

La importancia del medio de cultivo ha sido discutida ampliamente en diversos ensayos (Shahdadfar A et al. 2005). No existe un consenso universal en este campo, aunque los investigadores parecen favorecer el uso de  $\alpha$ MEM o de DMEM en sus estudios. El  $\alpha$ MEM (Minimal essential medium) es un medio creado por Harry Eagle que contiene aminoácidos, sales, vitaminas y glucosa. El DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) es una modificación del anterior realizada por Renato Dulbecco que contiene una mayor concentración de los componentes con la adición de hierro y rojo fenol.

El suero fetal bovino (FBS en inglés) es un complemento ampliamente usado. Aunque su uso está aprobado por las GMP ha generado controversia por la posibilidad de transmisión de enfermedades como la encefalopatía espongiforme bovina. Las CTM humanas cultivadas en sueros procedentes de animales han mostrado internalización de xenoantígenos (Shahdadfar A et al.



2005), y aunque la presencia de estas proteínas puede ser disminuida tras ser transferidas a suero humano puede comprometer sus capacidades inmunitarias. Este hecho ha de ser tenido en cuenta cuando éstas células son cultivadas con fines terapéuticos y su destino es la implantación en humanos (Bernardo ME et al. 2007).

El uso de suplementos procedentes de humanos por ejemplo el plasma rico en plaquetas lisadas tiene ventajas en cuanto a la inmunogenicidad (Doucet C et al. 2005), aunque la cantidad necesaria para los procesos destinados a cultivar células en gran número es demasiado elevada por lo que su uso no está extendido (Azouna NB et al. 2012).

Las CTM han de ser cultivadas en condiciones lo más parecidas a las fisiológicas. La concentración de gases es importante en el proceso de cultivo, dado que las CTM no están adaptadas a la alta concentración de oxígeno presente fuera del organismo (Sotiropoulou PA et al. 2006). Generalmente se usan incubadoras que regulan la humedad, temperatura y concentración de CO<sub>2</sub>. Las células son incubadas a 37°C con una humedad del 90% y atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

Un factor fundamental en la capacidad de expansión de las CTM en cultivo es la densidad del sembrado. Aunque en los estudios iniciales la mayoría de investigadores plantaban las células a una alta densidad, los últimos hallazgos indican que a densidades menores de 5,000-10,000 células/cm<sup>2</sup> se obtiene una mayor expansión (Schallmoser K et al. 2008).

Pese a que una de las características fundamentales que define a las células troncales es su capacidad para autorreplicación de forma indefinida *in vitro*, se ha observado que las CTM cuando son expandidas *in vitro* comienzan a presentar senescencia tras unos 40 ciclos de forma muy variable. También se ha observado que tras varios ciclos comienzan a aparecer células con variaciones fenotípicas no deseadas (Rubio D et al. 2005; Rosland GV et al. 2009; Ross AL et al. 2011). Se ha postulado la posibilidad de que algunos de estos cambios conlleven a la aparición de células cancerígenas, por lo que un control de calidad propuesto para evitar la aparición de tipos celulares no deseados o células en senescencia en los cultivos de las CTM es limitar los tiempos de cultivo a un tiempo medio máximo de 6 semanas.

### **Caracterización de las CTM**

La caracterización de las CTM se realiza mediante la visualización directa al microscopio y la detección de proteínas presentes en éstas células o secretadas por las mismas.

Cuando son cultivadas sobre una superficie de plástico éstas células presentan un aspecto fibroblastoide, aplanadas con expansiones similares a los fibroblastos. Éstas células son negativas para las tinciones histoquímicas de fosfatasa alcalina (a no ser que se encuentren en vía de diferenciación osteogénica), fosfatasa ácida y sudán negro.

La detección de antígenos de superficie se realiza habitualmente mediante anticuerpos asociados a fluorocromos. Las células así marcadas son analizadas por un citómetro que detecta la fluorescencia emitida por las células que han sido marcadas positivamente por el anticuerpo.

Como ya se ha mencionado previamente (Dominici M et al. 2006), las moléculas de superficie más representativas de las CTM son la CD105 (Endogлина), CD90 y CD73 (Ecto 5' nucleotidasa), aunque éstas células presentan en su superficie otros antígenos como HOP26 (También presente en fibroblastos y CFU-F), diversas integrinas ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha v$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 3$ ), receptores de interleucinas (rIL-1, rIL-3, rIL-4, rIL-6), receptores de factores de crecimiento (rTGF $\beta$  I y II, rNGF), receptor del factor de necrosis tumoral I y II y moléculas de adhesión (ICAM 1 y 2, VCAM-1). También es posible detectar moléculas secretadas por éstas células como las citocinas IL6, IL11 y VEGF (Majumdar MK et al. 2003; Flores-Figueroa 2006).

La caracterización negativa es fundamental para completar la definición de éstas células y descartar su procedencia hematopoyética. Así los marcadores característicos de células hematopoyéticas deben ser negativos en las CTM. Se incluyen antígenos leucocitarios, eritrocitarios y del resto de células y progenitores hematopoyéticos.

En los estudios actuales los marcadores más comúnmente analizados son los propuestos por la ISCT, que como ya se ha mencionado previamente considera como requisito la positividad en más de un 95% de las células de un

cultivo para CD90, CD105 y CD73, concomitantemente con menos de un 2% de positividad para CD45, CD34, CD14 ó CD11b, CD79 $\alpha$  ó CD19 y HLA-DR.

### **Inducción de la diferenciación hacia grasa, hueso y cartílago.**

Como se ha mencionado, un requisito imprescindible en la identificación de las CTM es demostrar su capacidad de diferenciación como mínimo hacia osteoblastos, condroblastos y adipocitos.

Esto se consigue mediante el cultivo de las CTM en presencia de factores que inducen la diferenciación hacia una u otra línea celular. Dichos factores y los formatos de cultivo empleados para este fin han sido descritos previamente en este trabajo. La mayoría de laboratorios utilizan medios comercialmente preparados, que incluyen diferentes sustancias en función del tejido al que se desea diferenciar esas células.

El éxito de la diferenciación es generalmente demostrado mediante la tinción de las muestras y su visualización al microscopio. Las tinciones deben ser específicas para cada tipo de diferenciación, y permitir la identificación de las características que permiten confirmar la transformación de las células. (Morfología celular, presencia de productos generados por las células diferenciadas en su interior o en la matriz extracelular)

## **1.6 USOS TERAPÉUTICOS DE LAS CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES**

El gran interés que han generado las CTM se debe a su capacidad para diferenciación hacia diferentes tejidos, lo que las hace especialmente útiles en tratamientos con fines de reparación o regeneración de tejidos dañados. Se ha descubierto que además de dichas propiedades poseen una mayor plasticidad de la esperada, con capacidad incluso para diferenciarse hacia tejidos de capas embrionarias diferentes de la que proceden. Recientemente se ha descrito que poseen propiedades inmunoregulatoras y mediación en la respuesta de injerto contra huésped, lo que no ha hecho sino incrementar el interés por éstas células.

Las células progenitoras encontradas en las fases iniciales del embrión en desarrollo y las células progenitoras procedentes de cordón umbilical o placenta, presentan un gran atractivo para el tratamiento de diversas patologías. No obstante sus métodos para la obtención y la naturaleza de éstas células plantean fuertes dilemas éticos. El descubrimiento de las capacidades de las CTMs del organismo adulto ha presentado una alternativa eficaz por sus menores compromisos éticos, facilidad de obtención y mejor comprensión de su biología. Esto ha permitido un gran avance en los últimos años, que se ha visto reflejado en un aumento importante de los estudios publicados en cuanto a terapia celular mediante el uso de CTMs.

## **Aplicaciones en enfermedades cardiovasculares**

Existen ensayos clínicos en fases I y II actuales que demuestran la eficacia de la infusión intravenosa o intracoronaria de CTMs para el tratamiento de infarto de miocardio o angina de pecho.

La mayoría de estos estudios reflejan mejoría de los parámetros de contractilidad cardíaca y disminución de la recurrencia de eventos adversos cardiovasculares tras la infusión intracoronaria o intravenosa de CTMs, e incluso la inyección directa en pared ventricular.

Sánchez y colaboradores (Sanchez PL et al. 2007) realizan un trabajo de revisión en el que analizan los resultados de diversos estudios incluyendo más de 400 pacientes. Su conclusión es que los datos de eficacia y seguridad avalan este tipo de tratamiento.

Recientes trabajos de revisión, como los realizados por Williams y Hare (Williams AR et al. 2011) o Wen Z. y colaboradores (Wen Z et al. 2011) describen los resultados de los últimos ensayos clínicos y los posibles mecanismos de acción por los cuales las CTMs producen los efectos reparativos. Dichos mecanismos no están claros, aunque se cree que es una conjunción de efectos paracrinós mediante la producción de citocinas antiinflamatorias, la inducción de angiogénesis, neoformación de cardiomiocitos e incluso diferenciación de las propias CTM en células cardíacas. Se observan

también fenómenos de remodelado de la cicatriz isquémica y disminución de aparición de arritmias (Chen SL et al. 2004; Katritsis DG et al. 2005).

El uso de las CTM para el tratamiento de la patología arterial oclusiva en miembros inferiores también ha sido estudiado ampliamente en los últimos años. Un trabajo muy reciente, publicado por Lee y colaboradores (Lee HC et al. 2012) ha demostrado mejoría en la sintomatología y evolución, así como una disminución en la tasa de amputaciones, en pacientes con enfermedad isquémica crónica de extremidades inferiores, que han sido tratados con concentrados de médula ósea en inyecciones intramusculares múltiples.

### **Aplicaciones en sistema nervioso central**

Pese a que se han encontrado beneficios en el tratamiento de determinadas lesiones del sistema nervioso central en modelos animales experimentales, existen muy pocos ensayos clínicos en humanos.

Hasta la fecha se han realizado ensayos clínicos en fases I y II de pacientes con Esclerosis Múltiple, Esclerosis Lateral Amiotrófica y lesiones crónicas de médula espinal (Karussis D et al. 2010; Bhanot Y et al. 2011; Hernandez J et al. 2011; Mohajeri M et al. 2011; Mazzini L et al. 2012).

Aunque no se han publicado resultados satisfactorios hasta la fecha. Venkataramana N.K y colaboradores (Venkataramana NK et al. 2012) realizaron un estudio en pacientes humanos afectados de enfermedad de

Parkinson infiltrando concentrados de CTMs en zona cerebral subventricular. Encontraron detención de la progresión de la enfermedad si se realiza en los inicios de ésta. No obstante el estudio está en fases precoces y los resultados han de interpretarse de manera cautelosa.

### **Aplicaciones en enfermedades hepáticas**

Aunque la mayoría de estudios han referido efectos beneficiosos en modelos de fibrosis hepática y fallo renal agudo en animales, son pocos los ensayos clínicos realizados en humanos. Amer E. y colaboradores (Amer ME et al. 2011) llevaron a cabo un ensayo clínico en 40 pacientes VHC+ con cirrosis hepática en fases avanzadas de la enfermedad. Asignaron un grupo de control de pacientes a quienes se aplicaron las terapias estándar y otro grupo experimental que recibió terapia mediante infiltración intrahepática o intraesplénica de CTMs procedentes de médula ósea cultivadas y estimuladas hacia el linaje hepatocítico. Los autores describen una mejoría significativa en el grupo tratado con terapia celular, con menor aparición de ascitis, mejoría de edemas periféricos, fatiga y parámetros analíticos, incluso mejores resultados en las escalas de enfermedad hepática y en la escala de Child.

Un estudio realizado por Peng y colaboradores (Peng L et al. 2011) realiza un ensayo comparando casos y controles en pacientes con fallo hepático producido por hepatitis B. En este caso se comparan los resultados de 52 pacientes tratados mediante infusión a través de la arteria hepática de CTMs de médula ósea autólogas frente a pacientes con terapia tradicional. A



diferencia del estudio anterior no se encuentran diferencias en cuanto al desarrollo de carcinomas hepatocelulares o en la mortalidad de ambos grupos, aunque sí una mejora en cuanto a los parámetros analíticos en el grupo de pacientes con terapia celular.

### **Aplicaciones en enfermedades gastrointestinales**

El tratamiento de pacientes con enfermedad de Crohn mediante la infusión de CTMs ha demostrado un efecto beneficioso, observándose curación de las úlceras en pared intestinal y en las fístulas. Recientes ensayos clínicos como los realizados por Duijvestein y colaboradores (Inyección intravenosa de concentrado de CTMs de médula ósea) y Ciccocioppo y colaboradores (Inyección directa de concentrados de CTMs procedentes de médula ósea autóloga sobre las úlceras y fístulas mediante colonoscopia) demuestran resultados satisfactorios, con curación de la mucosa intestinal y cierre total o parcial de las fístulas en la mayoría de los pacientes (Duijvestein M et al. 2010; Ciccocioppo R et al. 2011).

### **Aplicaciones en transplantes**

Dado el potencial inmunosupresor y la baja inmunogenicidad presentada por las CTM, éstas células han sido estudiadas intensivamente en el campo de los transplantes por su capacidad para la prevención del rechazo del injerto o el desarrollo de la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) (Ringden O et al. 2006; Le Blanc K et al. 2008; Arima N et al. 2010).

Pérez-Simón y colaboradores (Perez-Simon JA et al. 2011) publican los resultados de un ensayo clínico en fases I/II realizado en 18 pacientes con EICH resistente a tratamiento con corticoides. Éstos pacientes presentaban casos agudos o crónicos de EICH y recibieron tratamiento con CTMs procedentes de donantes sanos (CTM alogénicas), no necesariamente HLA haploidénticos. Las células fueron administradas en perfusión intravenosa en dosis única; 2 pacientes alcanzaron remisión completa de los síntomas, 9 pacientes presentaron remisión parcial y 7 no respondieron al tratamiento.

Relativo a la prevención del rechazo de órganos sólidos transplantados existen muy pocos estudios. Perico y colaboradores (Perico N et al. 2011) publican un estudio piloto los resultados del tratamiento mediante terapia inmunosupresora, combinada con la infusión intravenosa de CTMs autólogas de médula ósea, en 2 pacientes con trasplante renal. Las biopsias de control de los injertos mostraron mínima reacción inflamatoria con disminución de la actividad de linfocitos citotóxicos CD8, así como un aumento de linfocitos T reguladores. Ambos pacientes presentaron buena supervivencia y funcionalidad de los injertos durante la etapa de seguimiento.

Este campo de estudio está mostrando un auge en los últimos años, y se prevé la publicación de un mayor número de ensayos clínicos relativos a este tema.

## **Aplicaciones en cirugía ortopédica y traumatología**

La capacidad osteogénica y condrogénica de las CTM es bien conocida desde los inicios de la investigación en este campo. El sistema musculoesquelético procede del mesoderma, al igual que las CTM presentes en médula ósea, lo que proporciona una ventaja teórica en cuanto a la consecución de la diferenciación de estas células en tejidos de dicho sistema.

Estas propiedades, sobre todo la capacidad para la favorecer la formación de hueso y la facilidad de obtención a partir de aspirados de médula ósea, son bien conocidas por los cirujanos ortopédicos, quienes han aprovechado el potencial de éstas células para aplicarlas en el tratamiento de diversas enfermedades del hueso y las articulaciones desde hace décadas. Es por tanto factible pensar que el campo de la Cirugía Ortopédica y Traumatología es el que más se ha beneficiado del uso de las CTM en terapia, como lo demuestran la gran cantidad de estudios publicados.

Existen excelentes artículos de revisión sobre el uso de CTM en Ortopedia publicados recientemente (Arthur A et al. 2009; Shenaq DS et al. 2010; Schmitt A et al. 2012). En este apartado se hace un resumen de las aplicaciones más estudiadas.

## *Pseudoartrosis*

El tratamiento de la pseudoartrosis ha sido probablemente el primer uso terapéutico que se le ha dado a las CTM. El primer estudio realizado en humanos para el tratamiento de pseudoartrosis de tibia mediante la inyección de médula ósea procedente de cresta ilíaca fue el publicado por Connolly y colaboradores (Connolly J et al. 1989).

Desde entonces han sido numerosos los trabajos publicados reportando buenos resultados del tratamiento mediante el aporte de CTM procedentes de médula ósea, bien por inyección directa en el foco de pseudoartrosis o bien mediante el aporte de las células asociado a un injerto óseo a través de cirugía abierta.

Hernigou y su equipo (Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, et al. 2005), en un trabajo incluyendo 60 pacientes, demostraron la correlación entre el número de células implantadas y el éxito de curación de la pseudoartrosis, introduciendo así la técnica de centrifugación de médula ósea para obtener una muestra con alta concentración de CTMs.

Goel y colaboradores (Goel A et al. 2005) obtuvieron consolidación en 15 de 20 pacientes mediante esta técnica y demostraron la seguridad de la misma.

Recientemente en estudios realizados en animales se han demostrado buenos resultados empleando CTMs heterólogas, abriendo la posibilidad del

transplante para el tratamiento de pacientes en los que no es posible obtener un número adecuado de células progenitoras autólogas.

Un caso especial es la pseudoartrosis congénita de tibia. Un ensayo clínico reciente, publicado por Tikkanen y colaboradores (Tikkanen J et al. 2010), analiza la evolución de tres pacientes afectados por esta patología tratados mediante el aporte de CTMs en el foco de pseudoartrosis. Aunque se obtuvo formación de hueso y cierre del defecto óseo en 2 de los 3 pacientes, los resultados obtenidos son pobres. Sin embargo, este estudio abre la puerta a nuevas estrategias para el tratamiento de dicha enfermedad.

### *Necrosis avasculares*

La necrosis avascular ósea es una enfermedad que se observa generalmente a nivel de la cadera del adulto y en ocasiones a otros niveles como por ejemplo el astrágalo o la rodilla. Dicha enfermedad es producida por un déficit de aporte sanguíneo que produce un área de necrosis ósea, conduciendo a la aparición de dolor y pérdida de función articular. Su evolución natural conduce a la deformidad permanente de la articulación. En fases precoces, los tratamientos tradicionales incluyen la realización de perforaciones a nivel del área afecta y la descarga prolongada para promover la revascularización y reosificación.

El tratamiento combinado de perforaciones y aporte de concentrados de médula ósea se ha observado una técnica eficaz en fases precoces de la enfermedad evitando la progresión de la misma.

El estudio más reciente, hasta la fecha, es un ensayo clínico realizado por Zhao y colaboradores (Zhao D et al. 2012) en el que analizan los resultados de un grupo de 100 pacientes con necrosis avascular de cabeza femoral en estadio precoz asignados aleatoriamente a recibir tratamiento mediante perforaciones de cabeza femoral o tratamiento mediante el aporte de CTM de médula ósea autólogas expandidas *ex vivo*. En el grupo asignado a recibir tratamiento con descompresión 10 pacientes progresaron en la enfermedad, frente a 2 pacientes en el grupo asignado a tratamiento con CTM. La puntuación en la escala de Harris también fue significativamente mejor en este grupo.

### *Defectos óseos*

El tratamiento de lesiones que comprenden la pérdida de un segmento óseo depende en gran medida del tamaño de dicho defecto. La aplicación de injertos óseos, autoinjertos, es en ocasiones la única alternativa viable, aunque el éxito de dichas técnicas está limitado por el déficit de aporte vascular y la capacidad reducida de integración del injerto y la neoformación de hueso.

El uso de materiales inertes porosos, como por ejemplo hidroxiapatita, impregnados con células troncales mesenquimales ha demostrado resultados satisfactorios en el tratamiento de defectos óseos críticos en modelos animales. Kon y colaboradores (Kon E et al. 2000) demostraron formación satisfactoria de

hueso e integración de un implante de hidroxiapatita impregnada con CTMs en ovejas.

Quarto y colaboradores (Quarto R et al. 2001), realizaron uno de los primeros ensayos en humanos con defectos segmentarios en diáfisis de huesos largos tratados mediante la misma técnica, refiriendo curación satisfactoria en todos los casos.

Un estudio más reciente, realizado por Marcacci y colaboradores (Marcacci M et al. 2007), demuestra integración del injerto y buena consolidación ósea en cuatro pacientes con defectos óseos en diáfisis de huesos largos. Previo a la cirugía realizaban un estudio tridimensional del defecto óseo, y generaban un constructo de hidroxiapatita cerámica porosa con la misma forma del defecto a rellenar. Posteriormente impregnaban el injerto con CTMs cultivadas y expandidas *in vitro* y éste era implantado en el paciente y estabilizado mediante un fijador externo. Refieren fusión completa entre el implante y el hueso nativo a los 5-7 meses de la cirugía. En un seguimiento de 6 a 7 años no observaron complicaciones ni fracturas tardías en la zona del implante, apreciando una buena integración de los injertos.

### *Cartílago articular*

Dada la naturaleza avascular del tejido cartilaginoso, el tratamiento de las enfermedades que implican la lesión del mismo siempre ha representado un reto en el campo de la cirugía ortopédica.

El descubrimiento de la capacidad de las CTM para diferenciarse hacia cartílago ha generado una gran expectativa, y los estudios en este campo se han multiplicado en los últimos años, llegando a ser la tendencia actual.

En el caso de los defectos condrales, sobre todo a nivel de la rodilla, el tratamiento más empleado tradicionalmente ha sido la realización de microfracturas. Éste método, descrito inicialmente por Kenneth Hampden Pridie en 1959, consiste en realizar perforaciones en el hueso localizado en la zona del defecto condral, con el fin de obtener un sangrado procedente del hueso subcondral que genera un pseudocartílago por la fibrosis generada en dicha zona.

Actualmente dicho procedimiento se ha mejorado asociando técnicas que favorecen que las CTM procedentes del sangrado queden retenidas en la zona de la lesión y no se difundan al resto de la articulación. Dichas técnicas incluyen el recubrimiento de la lesión con parches de periostio o injertos sintéticos de colágeno.

En ocasiones, condrocitos del paciente son cultivados y expandidos *in vitro* y posteriormente inyectados en la zona de la lesión (Técnica ACI, del inglés *autologous chondrocyte implantation*; implante de condrocitos autólogos)

Recientemente Pascarella y colaboradores (Pascarella A et al. 2010) publican una técnica para el tratamiento de defectos condrales de rodilla. Dicha técnica consiste en obtener un injerto de matriz colágena sintética del mismo tamaño



de la lesión e impregnarlo con médula ósea aspirada a través de microperforaciones realizadas en hueso subcondral en el mismo acto quirúrgico. Encuentran buenos resultados en cuanto a disminución del dolor, movilidad y controles mediante RMN.

Centeno y colaboradores (Centeno CJ et al. 2008) publican un único caso de meniscopatía, tratado mediante inyección intraarticular de CTMs autólogas expandidas *in vitro* procedentes de médula ósea de cresta ilíaca, en que se observó un aumento significativo en el volumen meniscal medido mediante RMN.

### *Tendinopatías*

Se ha demostrado la capacidad de las CTM humanas para generar un tejido similar al tendón.

Los estudios realizados hasta la fecha demuestran la capacidad de las CTM para regenerar defectos tendinosos y mejorar el dolor producido por lesiones a nivel de la unión miotendinosa u osteotendinosa. Lamentablemente dichos estudios han sido realizados en animales y tras realizar una extensa búsqueda bibliográfica no figuran ensayos clínicos realizados en humanos.

### *Artrodesis articular quirúrgica*

En cirugías en las que el objetivo fundamental es alcanzar la artrodesis de una articulación se ha observado también la ayuda de la terapia mediante el aporte de CTMs como técnica adyuvante al acto quirúrgico.

Una de las cirugías más habituales es la artrodesis vertebral lumbar para el tratamiento de lumboartrosis y enfermedad degenerativa lumbar. Un procedimiento cada vez más habitual es el aspirado intraoperatorio de médula ósea de cresta ilíaca y su aplicación sobre la cruentación ósea y el injerto óseo como técnica adyuvante para favorecer la fusión.

Kerr y colaboradores (Kerr EJ et al. 2011) analizan a 52 pacientes tratados mediante instrumentación posterior de columna y artrodesis, suplementando la técnica aportando un gel rico en células troncales mesenquimales alogénicas (Osteocell®). Encuentran la consecución de una artrodesis sólida en el 92.3% de los pacientes a los 5 meses de seguimiento. Asimismo, encuentran un mayor tiempo necesario para obtener la fusión correlacionado con edad mayor de 50 años y en pacientes fumadores.

### *Osteogénesis Imperfecta*

La osteogénesis imperfecta es una enfermedad de causa genética, que consiste en un defecto en la síntesis de colágeno tipo I que conduce a la

fragilidad ósea, y por tanto, a la aparición de fracturas ante traumatismos mínimos y un déficit en el crecimiento y desarrollo del esqueleto.

Una de las terapias que ha demostrado su eficacia parcial es el uso de Bifosfonatos, aunque hasta la fecha no se ha encontrado ninguna cura eficaz para esta enfermedad.

Horwitz y colaboradores (Horwitz EM et al. 2002) publicaron un ensayo clínico realizado en 6 pacientes pediátricos afectados por osteogénesis imperfecta. En dicho ensayo, los pacientes recibieron un trasplante de células troncales mesenquimales procedentes de donantes sanos. Las células fueron expandidas in vitro e infundidas en dos dosis separadas por un intervalo de 2 a 3 semanas. La primera dosis se realizó a razón de  $1 \times 10^6$  células/ Kg de peso, y la segunda a una dosis de  $5 \times 10^6$  células/Kg de peso. La respuesta clínica consistió en un aumento en las curvas de estatura, pasando la velocidad de crecimiento de 20% durante los 6 meses previos al trasplante a un 60-94% posteriormente. También se observó en un paciente un incremento significativo en la densidad mineral ósea, aunque no en el resto. En dicho estudio no se indica si también se observaron variaciones en la aparición de fracturas nuevas.

Aunque no se han reportado nuevos ensayos clínicos en humanos desde el mencionado previamente, esta investigación abre las puertas al futuro en el tratamiento de esta enfermedad.

## **2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DEL ESTUDIO**

La fuente más empleada para la obtención de células troncales mesenquimales es la médula ósea del organismo adulto extraída de la cresta ilíaca.

Las características de éstas células han sido exhaustivamente estudiadas como se ha mencionado en los apartados previos. La concentración media de CTMs hallada en médula ósea de cresta ilíaca varía en función de los estudios, pero se estima que existe aproximadamente una célula troncal mesenquimal por cada 10.000 a 100.000 células mononucleares (Brinchmann JE 2008; Jones E et al. 2008; Kasten P et al. 2008; Lubis AM et al. 2011).

La obtención de médula ósea a dicho nivel se obtiene generalmente por medio de la punción ósea con trócares canulados, que permiten aspirar grandes cantidades de médula conteniendo células progenitoras.

Dicho método de punción está ampliamente estandarizado y es el más empleado habitualmente. Mediante esta técnica es posible obtener cantidades elevadas, de hasta 1 L, y sin necesidad de anestesia general, de aspirado de médula ósea, conteniendo un número de CTMs suficiente para emplearlo directamente en terapia sin necesidad de expandir las células en laboratorio.

Pese a que la punción-aspiración de médula ósea de la cresta ilíaca es considerado el método “gold standard” para la obtención de células troncales mesenquimales de médula ósea, dicha técnica presenta una serie de inconvenientes a tener en cuenta.

La técnica quirúrgica para la punción ósea de la pelvis es demandante y requiere entrenamiento. La anatomía de la pelvis ósea es compleja, por lo que la elección del punto de perforación y la dirección del trócar requiere un buen conocimiento de la anatomía para evitar lesiones de estructuras adyacentes o un malposicionamiento de la aguja. La punción se puede realizar en decúbito supino, a nivel de cresta ilíaca anterior, o en decúbito prono en cresta ilíaca posterior. En cualquiera de los dos abordajes hay que tener en cuenta la cercanía de estructuras anatómicas que pueden ser lesionadas durante el procedimiento, como el nervio femorocutáneo y la arteria hipogástrica (vía anterior) o las arterias ilíacas o las raíces nerviosas sacras (vía posterior).

Como cualquier procedimiento quirúrgico no está exento de complicaciones. Seiler y colaboradores (Seiler JG et al. 2000) realizan una revisión de complicaciones tras punción y toma de injerto de cresta ilíaca. Dichas complicaciones incluyeron lesión arterial, lesión ureteral, dolor crónico en el punto de punción, hematoma e infección.

La complicación más frecuente es la aparición de hematoma en el lugar de la punción, que en ocasiones puede tener implicaciones graves. Tal es el caso reportado por Sarigianni y colaboradores (Sarigianni M et al. 2011) donde exponen el caso de un varón de 83 años que sufrió un hematoma masivo en la nalga tras punción de cresta ilíaca que requirió la transfusión de 3 concentrados de hematíes por anemización.

Otros casos más graves pero menos frecuentes son por ejemplo el publicado por Martino y colaboradores (Martino M et al. 2012), consistente en una lesión de la arteria ilíaca interna, o excepcionales como el referido por Gladden y colaboradores (Gladden K et al. 2011), consistente en una fractura del ilíaco tras biopsia por punción de cresta.

En 2001, Bain realizó una encuesta a los miembros de la Sociedad Británica de Hematología, solicitando que reportasen todos los casos de complicaciones graves en pacientes en los que se realizó biopsia de médula ósea de cresta ilíaca mediante punción simple o con trefina (Bain BJ 2005). De 19.259 procedimientos sólo se reportaron 16 efectos adversos, siendo la hemorragia grave el más frecuente (11 casos). Se indica una frecuencia de efectos adversos graves del 0,08%.

En cirugía ortopédica muchas veces se realiza el aspirado de forma intraoperatoria, con el fin de aplicar las células obtenidas en el lugar de la lesión durante el mismo acto quirúrgico. En estos casos otro inconveniente de realizar la punción de cresta ilíaca es su accesibilidad.

Para procedimientos en decúbito prono (por ejemplo cirugía de columna vertebral) no existe dicho inconveniente, dado que se puede realizar la punción de cresta posterior. En los procedimientos en decúbito supino suele ser necesario la creación de un segundo campo quirúrgico estéril para acceder a cresta ilíaca anterior, cuya punción es técnicamente más difícil y de mayor riesgo.

Dados los datos previamente mencionados es comprensible valorar otras fuentes para la punción alternativas a la cresta ilíaca.

Las metáfisis de los huesos largos presentan una estructura interna muy similar al hueso esponjoso de la cresta ilíaca. Engelstad y Morse (Engelstad ME et al. 2010) realizan un estudio en 10 cadáveres comparando las características del hueso trabecular hallado a nivel de cresta ilíaca posterior, anterior y metáfisis tibial proximal. Hallaron similitudes en cuanto a volumen de hueso esponjoso trabecular entre cresta ilíaca posterior y tibia, siendo este volumen significativamente superior al de cresta ilíaca anterior.

El uso de metáfisis proximal de tibia como sitio donante para la extracción de injerto de hueso esponjoso está muy extendido y su eficacia ha sido bien documentada. Dicha eficacia es entendida en términos de integración del injerto y reosificación, y es debida a su papel osteoconductor y osteoinductor. (Herford AS et al. 2003; Geideman W et al. 2004; Lezcano FJ et al. 2007; Zouhary KJ 2010; Myeroff C et al. 2011).

A pesar de su probada eficacia como fuente de injerto esponjoso, la presencia de CTM en médula ósea de las metáfisis alrededor de la rodilla ha sido poco estudiada.



Beitzel y colaboradores (Beitzel K et al. 2012) describen la presencia de CTMs en metáfisis distal de fémur, obtenidas mediante punción-aspiración durante la reconstrucción artroscópica de ligamento cruzado anterior.

Las metáfisis de fémur y tibia alrededor de la rodilla ofrecen un área anatómica con gran accesibilidad y su anatomía es bien conocida por los cirujanos ortopédicos. La cara anterior de la rodilla presenta un área relativamente exenta de estructuras vasculonerviosas y las referencias anatómicas son fácilmente palpables, por lo que la punción a dicho nivel presenta un riesgo teórico bajo.

## **2.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO**

### **Hipótesis conceptuales**

1. La médula ósea de metáfisis distal de fémur y cresta ilíaca anterior tienen la misma densidad celular.
2. La médula ósea de metáfisis proximal de tibia y cresta ilíaca anterior tienen la misma densidad celular.
3. La médula ósea de las metáfisis distal de fémur y proximal de tibia tienen la misma densidad celular.
4. Existen CTM en médula ósea de metáfisis distal de fémur.
5. Las CTM de la médula ósea de metáfisis distal de fémur tienen características similares a las halladas en médula ósea de cresta ilíaca.
6. Existen CTM en médula ósea de metáfisis proximal de tibia.
7. Las CTM de la médula ósea de metáfisis proximal de tibia tienen características similares a las halladas en médula ósea de cresta ilíaca.

### **Hipótesis operativas ( $H_0$ )**

1. Existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la concentración de CMN halladas en médula ósea de metáfisis distal de fémur y cresta ilíaca anterior.

2. Existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la concentración de CMN halladas en médula ósea de metáfisis proximal de tibia y cresta ilíaca anterior.
3. Existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la concentración de CMN halladas en médula ósea de metáfisis distal de fémur y metáfisis proximal de tibia.
4. No existen CTM en médula ósea de metáfisis distal de fémur
5. Las CTM de médula ósea de metáfisis distal de fémur no tienen fenotipo, capacidad de expansión y diferenciación hacia grasa, hueso y tendón, similares a las halladas en médula ósea de cresta ilíaca anterior.
6. No existen CTM en médula ósea de metáfisis proximal de tibia
7. Las CTM de médula ósea de metáfisis proximal de tibia no tienen fenotipo, capacidad de expansión y diferenciación hacia grasa, hueso y cartílago, similares a las halladas en médula ósea de cresta ilíaca anterior.

## **2.2 OBJETIVOS DEL ESTUDIO**

Ante los datos previamente mencionados es necesario investigar la presencia y características de células troncales mesenquimales a nivel de las metáfisis distal de fémur y proximal de tibia para valorar su potencial como fuente alternativa a la cresta ilíaca, así como describir una técnica para su obtención de forma sencilla y segura.

**Los objetivos del estudio son:**

1. Describir una técnica para la obtención de médula ósea de las metáfisis distal de fémur y proximal de tibia.
2. Realizar un análisis comparativo de la densidad de células mononucleadas de la médula ósea de las metáfisis distal de fémur y proximal de tibia con respecto a la médula ósea de cresta ilíaca.
3. Demostrar la presencia de células troncales mesenquimales en médula ósea de las metáfisis distal de fémur y proximal de tibia, mediante aislamiento y caracterización.
4. Comparar las características de las CTM procedentes de médula ósea de metáfisis distal de fémur y proximal de tibia, en cuanto a fenotipo, capacidad de expansión y diferenciación hacia grasa, hueso y cartílago, con las CTM procedentes de médula ósea de cresta ilíaca.



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### 3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

El estudio consiste en la obtención de médula ósea de metáfisis distal de fémur y proximal de tibia mediante punción-aspiración, y el procesamiento de las muestras en laboratorio para el aislamiento e identificación de las células troncales mesenquimales.

Con el fin de poder comparar los resultados en cuanto a número de células y sus características, se realizó además extracción de médula ósea de cresta ilíaca del mismo individuo, ya que es considerada como el “Gold Standard”.

El estudio se realizó en el Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Los sujetos del estudio fueron pacientes voluntarios con artrosis de rodilla, programados para ser intervenidos de prótesis total de rodilla. La extracción de las muestras se realizó en quirófano en los instantes previos a la cirugía de reemplazo articular, y el procedimiento para el aislamiento, expansión y caracterización de las células troncales mesenquimales fue realizado en el Laboratorio de Producción Celular de la misma institución. La extracción, procesamiento y análisis de las muestras se realizó de manera prospectiva y no randomizada.

Dicho estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica–Área 1 el día 1 de Junio de 2009 (anexo 8.1), certificando que dicho estudio:

- Se plantea siguiendo los requisitos legalmente establecidos y su realización es pertinente.

- Se cumplen los requisitos de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.
- La capacidad del investigador, sus colaboradores y las instalaciones y medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.



### 3.2 SELECCIÓN DE PACIENTES

Los sujetos seleccionados fueron pacientes con gonartrosis, candidatos a cirugía de reemplazo articular mediante prótesis total de rodilla. Tras comprobar que no presentaban ninguno de los criterios de exclusión y, tras la aceptación mediante consentimiento informado escrito (anexo 8.2), fueron incluidos en el estudio.

#### *Criterios de exclusión*

- No obtención de consentimiento informado.
- Edad mayor de 75 años.
- Tratamiento con citostáticos o corticoides.
- Alcoholismo.
- Presencia de lesiones dérmicas en extremidades inferiores.
- Radioterapia previa afectando a pelvis o rodilla.
- Infección activa.
- Anemia (Hb < 10.0 gr/dL).
- Leucopenia (Leucocitos < 4000/mm<sup>3</sup>).
- Procesos tumorales activos.

23 pacientes aceptaron participar en el estudio, de los cuales 3 pacientes presentaban uno o mas criterios de exclusión, por lo que en total participaron en el estudio un total de 20 pacientes, 4 varones y 16 mujeres con edades comprendidas entre 64 y 75 años (media 70,9 años).

A cada paciente se le extrajo una muestra de médula ósea de cresta ilíaca, de metáfisis distal de fémur y de metáfisis proximal de tibia.

En tres pacientes las muestras de fémur y de tibia se tomaron con el manguito de isquemia activado. Como se indica más adelante en el apartado de técnica de aspirado medular, estas muestras no fueron tomadas acorde al protocolo, por lo que no fueron tenidas en cuenta en el análisis estadístico de los datos. En un paciente no se pudo obtener médula ósea tras punción aspiración de tibia por razones desconocidas.

Al final del estudio contamos en total con 20 muestras de médula ósea de cresta ilíaca, 17 de metáfisis distal de fémur y 16 de metáfisis proximal de tibia.

### 3.3 TÉCNICA DE OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

#### 3.3.1 Técnica de aspirado medular.

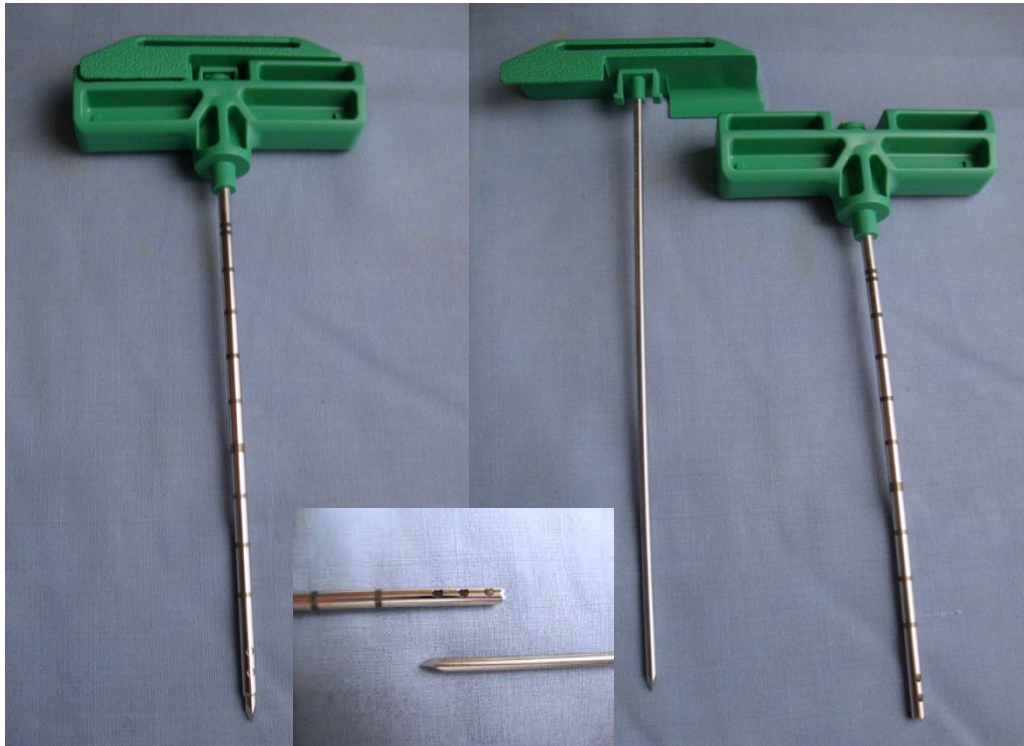
Las muestras fueron tomadas siempre por el mismo investigador (JN) en los instantes previos al inicio de la intervención de artroplastia total de rodilla.

Las muestras se tomaron en el ambiente estéril de quirófano con el paciente en decúbito supino y anestesia raquídea en nivel L1.

La preparación del paciente incluye la realización de campos quirúrgicos estériles exponiendo tanto la rodilla objeto de la cirugía como la cresta ilíaca anterior ipsilateral. La piel fue tratada mediante lavado inicial con una solución de povidona yodada jabonosa y posteriormente tratamiento de la superficie expuesta con povidona yodada (*Betadine*®, Meda Pharma S.A, España).

El manguito de isquemia se encuentra aplicado en la raíz del muslo pero no hinchado. Es importante reseñar que la extracción de las muestras de fémur y tibia se realizan sin haber aplicado todavía expresión venosa ni isquemia sobre el miembro. El motivo fundamental para ello es reducir el tiempo de isquemia sobre el miembro para minimizar la iatrogenia, aunque no se conoce qué efecto puede tener el empleo de expresión venosa, y aplicación de isquemia, en la calidad de las muestras obtenidas de la médula ósea de huesos largos.

Para realizar el aspirado de médula ósea se empleó un trócar canulado con orificios laterales de la casa Synthes (BMA system®, Synthes, Germany). Dicho trócar se compone de una vaina externa con orificios laterales y una aguja central para prevenir la obturación del canal durante la punción. El mango es apto para la percusión mediante martillo, y consta de una conexión Lúer-Lock para el aspirado mediante jeringa (figura 4).



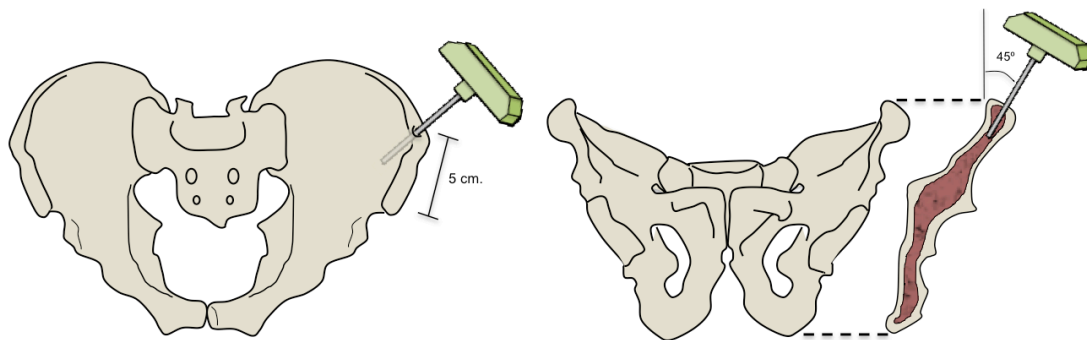
*Figura 4. Trócar canulado para punción aspiración de médula ósea BMA System (Synthes®).*

*Obsérvese la presencia de orificios laterales en el extremo del trócar.*

### *Punción de cresta ilíaca anterior*

Para localizar el punto de punción en cresta ilíaca se palpan el reborde de la cresta y la espina ilíaca anterosuperior. El punto de punción se encuentra localizado 5 cm posteriores a la espina ilíaca anterosuperior.

El trócar se introduce a unos 2 cm de profundidad a través de la cortical de la cresta en una dirección aproximadamente de 45° caudales en el plano coronal y 30° posteriores en el plano sagital. La inserción se realiza manualmente aunque en ocasiones es necesario la impactación con ayuda de martillo (figura 5).



*Figura 5. Esquema de punción de cresta ilíaca. La punción se realiza a unos 5 cm de la EIAS para evitar el riesgo de lesión del n. femorocutáneo y en una dirección aproximada de 45° en el plano coronal.*

### *Punción de metáfisis femoral distal*

Para minimizar la iatrogenia causada por la toma de muestras los puntos de punción en piel sobre fémur y tibia se realizan sobre la línea de incisión programada para la cirugía de reemplazo articular.

La punción de piel sobre fémur distal se realiza en un punto situado 1 cm inmediatamente proximal al polo superior de la rótula. El trócar se dirige en una dirección caudal de aproximadamente 30°, atravesando el tendón cuadricipital hasta palpar la cortical anterior del fémur. El trócar se introduce a una profundidad de 1 cm, atravesando la cortical manualmente o mediante impactación con martillo (figura 6).

*Punción de metáfisis tibial proximal*

El punto de punción sobre tibia se localiza palpando la tuberosidad tibial anterior. En este punto, la punción se realiza en una dirección paralela a la superficie articular de la tibia en dirección anteroposterior, atravesando la cortical anterior de la tibia hasta una profundidad de 2 cm aproximadamente (figura 6).

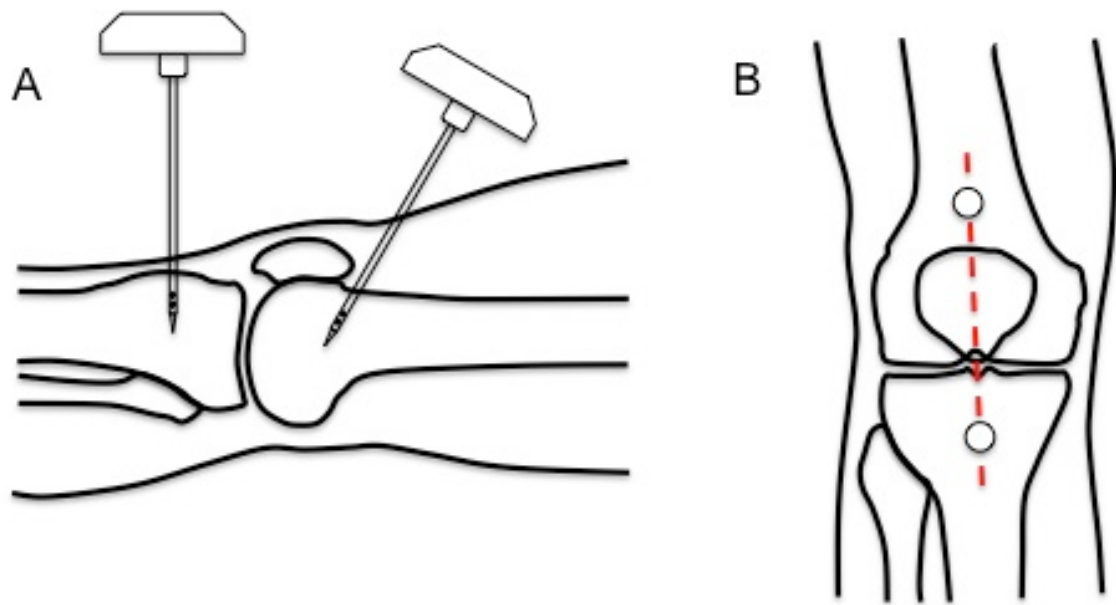


Figura 6. Esquema de punciones para metáfisis distal de fémur y proximal de tibia. A. En plano sagital, punción femoral a 1 cm proximal a polo superior de rótula en unos 30° dirección caudal. Punción tibial paralela a superficie articular sobre tuberosidad tibial anterior. B. Las punciones se realizan sobre la incisión de piel programada para la cirugía de reemplazo articular.

La técnica de aspirado se realiza mediante vacío con jeringa. Por cada 2 ml de médula ósea aspirada el trócar se gira un cuarto de vuelta para cambiar la orientación de los orificios laterales, así como la profundidad del trócar y su dirección. En cada punción se obtuvieron un mínimo de 5 ml de médula ósea.





*Figura 7. Ejemplo de punción de metáfisis distal de fémur.*

El aspirado se realiza de este modo para evitar la dilución de médula ósea con sangre periférica. Muschler y colaboradores demostraron que el aspirado realizado de este modo obtiene una mayor concentración de células mononucleadas que aspirando volúmenes mayores en una posición fija (Muschler GF et al. 1997).





*Figura 8. Ejemplo de punción de metáfisis proximal de tibia.*

Inmediatamente tras completar el aspirado, la médula ósea es introducida en tubos heparinizados (Heparina Mayne® 5%, laboratorios Rovi. 1 ml cada 10 ml de médula ósea). identificados mediante etiquetas que indican el número de paciente y la procedencia de la muestra (cresta, fémur o tibia). Inmediatamente son transportadas al Laboratorio de Terapia Celular de nuestra institución para su procesamiento.

El punto de punción en cresta ilíaca es infiltrado localmente con Bupivacaína al 0,5% como apoyo para la analgesia postoperatoria.

Tras el procedimiento, la intervención quirúrgica para artroplastia total de rodilla se realiza según lo previsto.

La analgesia postoperatoria, el inicio de rehabilitación precoz y la autorización de carga en los pacientes del estudio, se aplicó sin cambios con respecto al protocolo habitual empleado en los pacientes intervenidos de PTR en nuestra institución.

### 3.4 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS EN LABORATORIO

Las muestras fueron procesadas por el personal del Laboratorio de Terapia Celular del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Dicho laboratorio cuenta con una sala blanca para investigación y los recursos materiales para ello, cumpliendo con las normativas de las GMP (*Good Manufacturing Practices*).



Figura 9. Instalaciones del Laboratorio de Terapia Celular del HGUGM.



*Figura 10. Sala blanca del Laboratorio de Terapia Celular del HGUGM.*

### **3.4.1 Aislamiento y expansión de las CTM de médula ósea**

Para el aislamiento e identificación de las células troncales mesenquimales en las muestras, hemos empleado los criterios definidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) que definen éstas células por (Dominici M et al. 2006):

- Adherencia al plástico.
- Inmunofenotipo con presencia o ausencia de determinados antígenos de superficie.
- Capacidad de diferenciación hacia grasa, hueso y tendón.



El proceso comienza con un filtrado de las muestras para eliminar coágulos y restos de grasa procedentes del aspirado. Dicho filtrado se realizó con el filtro estándar de 200  $\mu\text{m}$  habitualmente empleado en las transfusiones sanguíneas.

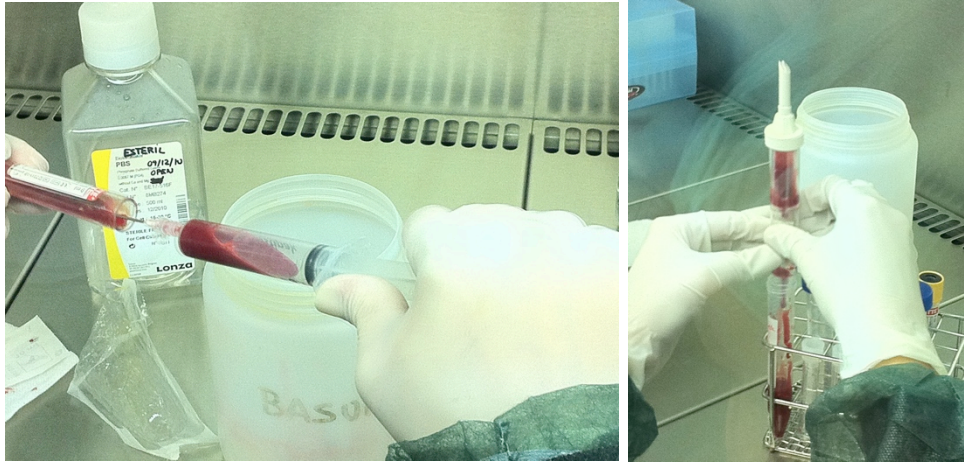


Figura 11. Filtrado de las muestras a través de filtro de 200  $\mu\text{m}$ .

De cada muestra se tomaron 100  $\mu\text{l}$  para realizar hemograma y citometría para confirmar que corresponde a médula ósea y no presenta contaminación con sangre periférica.

#### *Obtención de las células mononucleadas de la muestra*

Se realizó obtención de las células mononucleadas de las muestras mediante centrifugación por gradiente de densidad con Ficoll. Esta técnica facilita la identificación de la capa que contiene las células mononucleadas tras la centrifugación. Dicha técnica consiste en la adición de un compuesto con una densidad intermedia a la presentada por la capa de células mononucleadas y la formada por los eritrocitos y granulocitos, de modo que tras centrifugar la muestra ambas capas quedan separadas por el compuesto, facilitando así el

aspirado de las células mononucleares evitando aspirar células de la capa más densa (figura 12).

En el presente estudio hemos empleado Ficoll (Ficoll Paque<sup>®</sup> Premium, GE Healthcare) en una proporción de 4 partes de Ficoll por cada 6 partes de médula ósea. La médula ósea se introduce lentamente mediante pipeta en un tubo Falcon (fondo cónico) conteniendo la cantidad adecuada de Ficoll. A continuación se centrifuga la muestra a 400 G (1200 r.p.m) durante 30 minutos a 22°C (figura 13). La centrífuga empleada es una Eppendorf modelo 5810R (Eppendorf Ibérica<sup>®</sup>, *Eppendorf AG*).

Tras la centrifugación se observan correctamente las diferentes capas con los componentes de la médula ósea (figura 14). En el caso de las muestras procedentes de fémur y tibia se observó además un abundante sobrenadante de grasa.

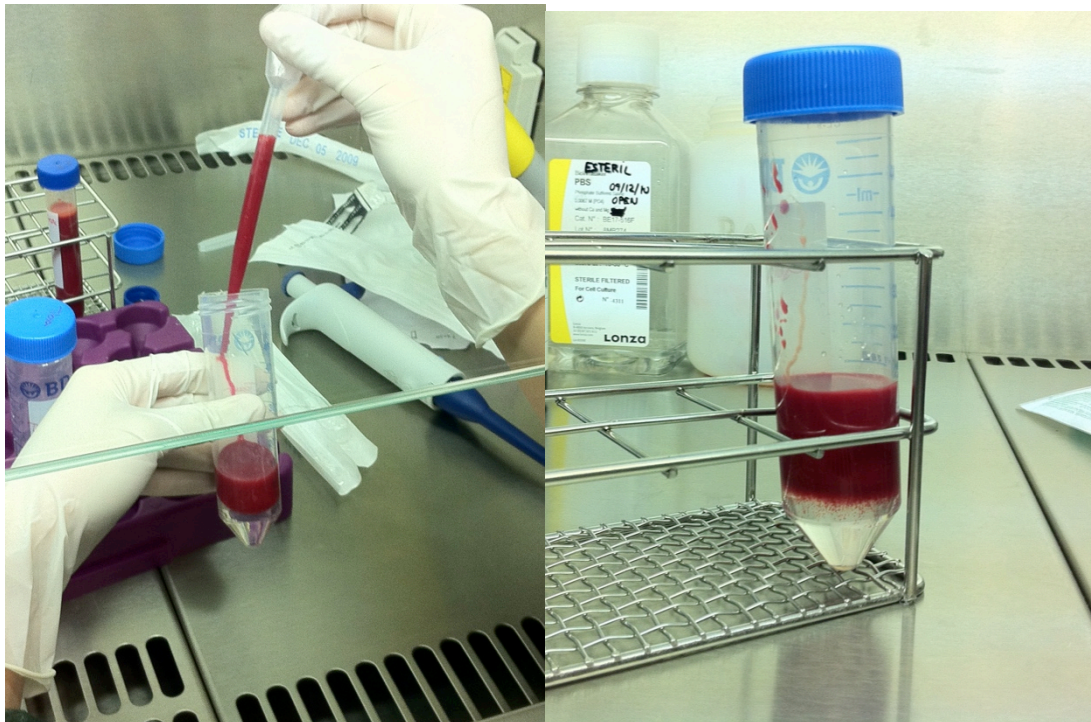


Figura 12. La médula ósea se añade lentamente a un tubo con la cantidad correspondiente de Ficoll para evitar la mezcla de ambas sustancias.

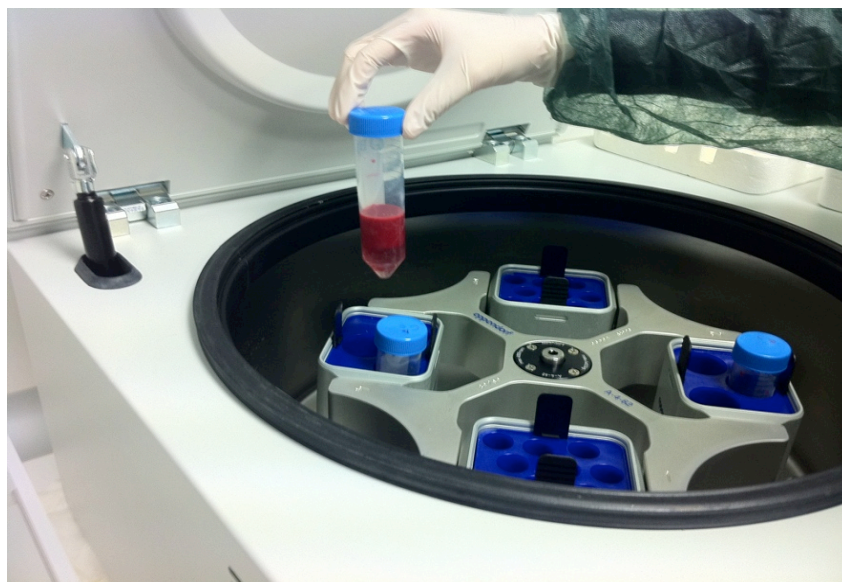


Figura 13. La muestra se centrifuga a 400G (1200 r.p.m) durante 30 minutos a 22°C.



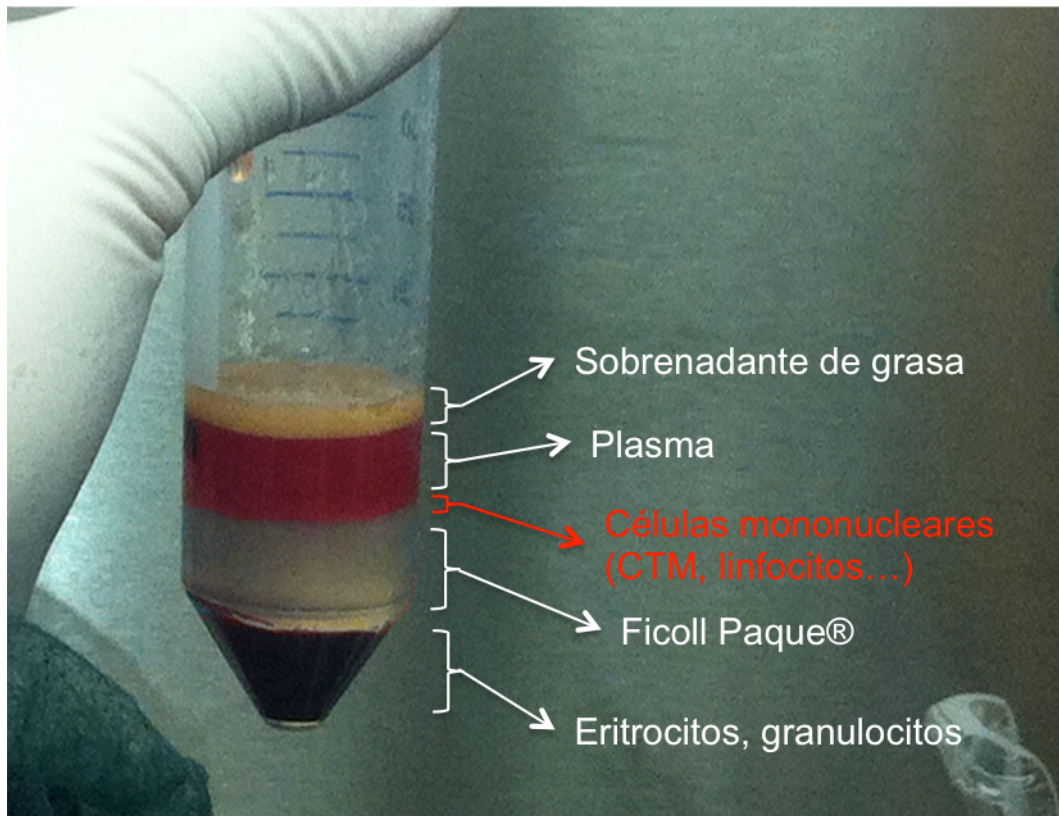


Figura 14. Muestra tras la centrifugación. Se observan las diferentes capas. La capa intermedia contiene las células mononucleares, encontrándose entre ellas las células troncales mesenquimales.

La capa intermedia que contiene las células mononucleadas es obtenida mediante aspiración con pipeta y es sometida a dos lavados para eliminar restos de ficoll y elementos celulares no deseados. Dicho lavado se realiza diluyendo la muestra en DMEM simple (DMEM: Medio de Eagle modificado por Dulbecco. *Miltenyi Biotec*®, GE Healthcare, Alemania) y centrifugando la muestra durante 15 minutos a 400G. El DMEM completo consta de DMEM, Penicilina-Estreptomicina al 1%, FBS (suero bovino fetal) y Glutamato, mientras que el DMEM simple únicamente contiene DMEM y Penicilina-Estreptomicina al 1%.

Para obtener una mayor pureza de la muestra y eliminar eritrocitos remanentes la muestra se somete a choque osmótico. Para realizar el choque osmótico se añade 1 ml de agua destilada estéril, sometiendo la muestra a agitación durante un minuto. Para neutralizar el choque osmótico se añade la misma cantidad de DMEM completo y agitación. Se elimina el medio, y el pellet conteniendo las células mononucleadas se resuspende en DMEM completo.

#### *Recuento de CMN y determinación de la viabilidad*

Para determinar el número de CMN presentes se toman 10  $\mu$ l y se realiza un recuento manual en cámara de Neubauer o hemocitómetro (Cámara doble, Neubauer Improved<sup>®</sup>, *Marienfield Laboratory Glassware*, Alemania).

La cámara de Neubauer es un dispositivo de precisión que consta de un portaobjetos con una depresión central de forma cuadrada y una retícula calibrada apta para su visualización al microscopio de campo libre.

La profundidad de la cámara es de 0,1 mm, y el cuadrado es de 3 mm. de lado. La retícula de división tiene dimensiones conocidas, por lo que, conociendo la profundidad y el número de cuadrículas contabilizadas es posible conocer el volumen de la muestra, y por tanto la concentración celular en función del número de células contabilizadas.

Para determinar la viabilidad celular se realiza una tinción con Azul Tripán a una proporción de 1:1. El Azul Tripán tiñe de azul las células muertas, en



cambio es incapaz de atravesar la membrana de las células vivas, que se observan de color blanco (figura 15).

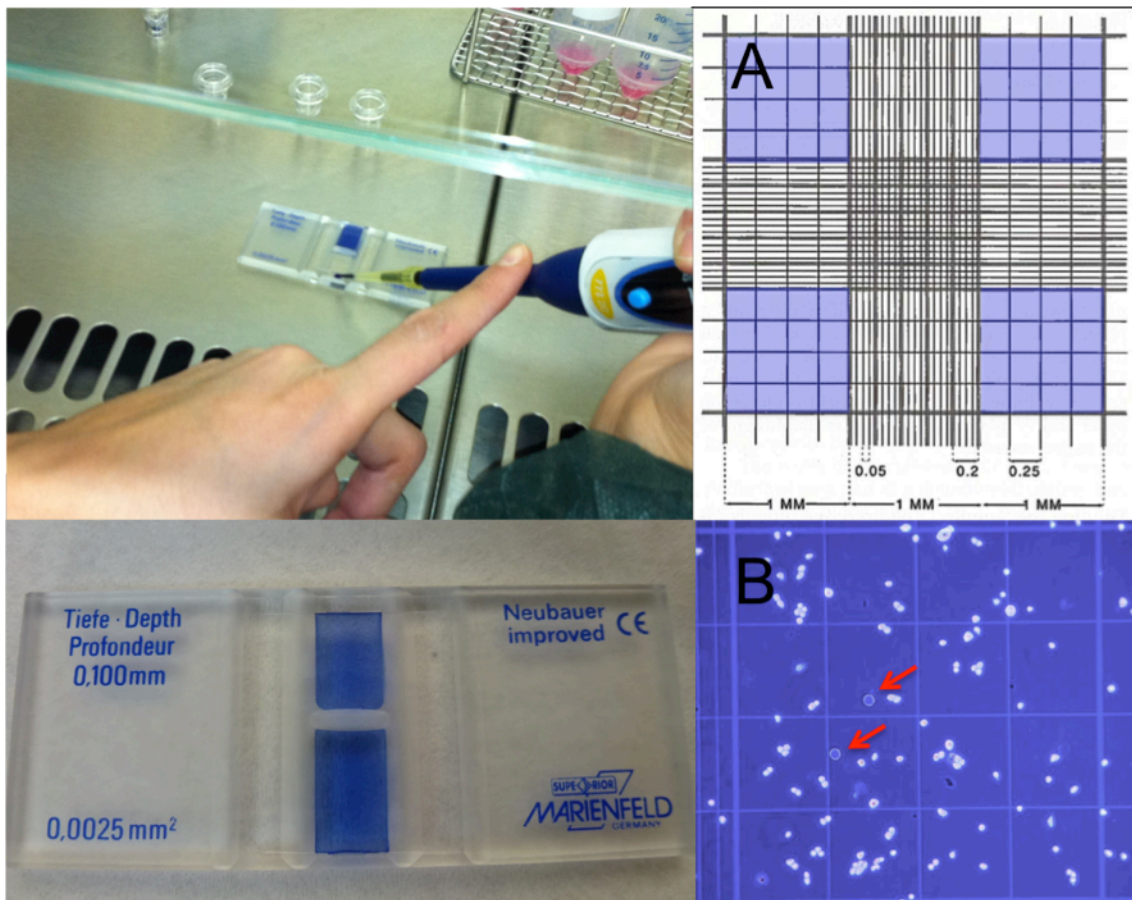


Figura 15. Cámara de Neubauer. A. Dimensiones del hemocitómetro. Se contabilizan las células en las áreas marcadas en azul. B. Visualización al microscopio. Las flechas rojas indican células muertas teñidas de azul tripán.

Conociendo las dimensiones de la cámara, el número de células contabilizadas y los volúmenes de dilución es posible calcular la concentración de células mononucleadas y por tanto el número total de CMN de la muestra. En este caso, sabiendo que: la profundidad de la cámara es de 0,1 mm, el lado de uno de los cuatro cuadrados grandes es de 1 mm, y el factor de dilución es 1:1 la fórmula sería:

$$n^{\circ} \text{ cls/ml} = \frac{(n^{\circ} \text{ cls contadas}/4)}{2} \times 10.000$$

La viabilidad se expresa en porcentaje de células vivas respecto al nº total de células.

Conocer el número de células en la muestra es importante para realizar los cultivos, dado que nos permite saber la superficie que podemos cubrir con las células. En este estudio la siembra de células en los frasco de cultivo de cultivos se realizó a razón de 160.000 cls mononucleadas/cm<sup>2</sup>.

Previo al cultivo, se toma una muestra de las CMN obtenidas para realización de citometría.

#### *Cultivo y expansión de las CTM*

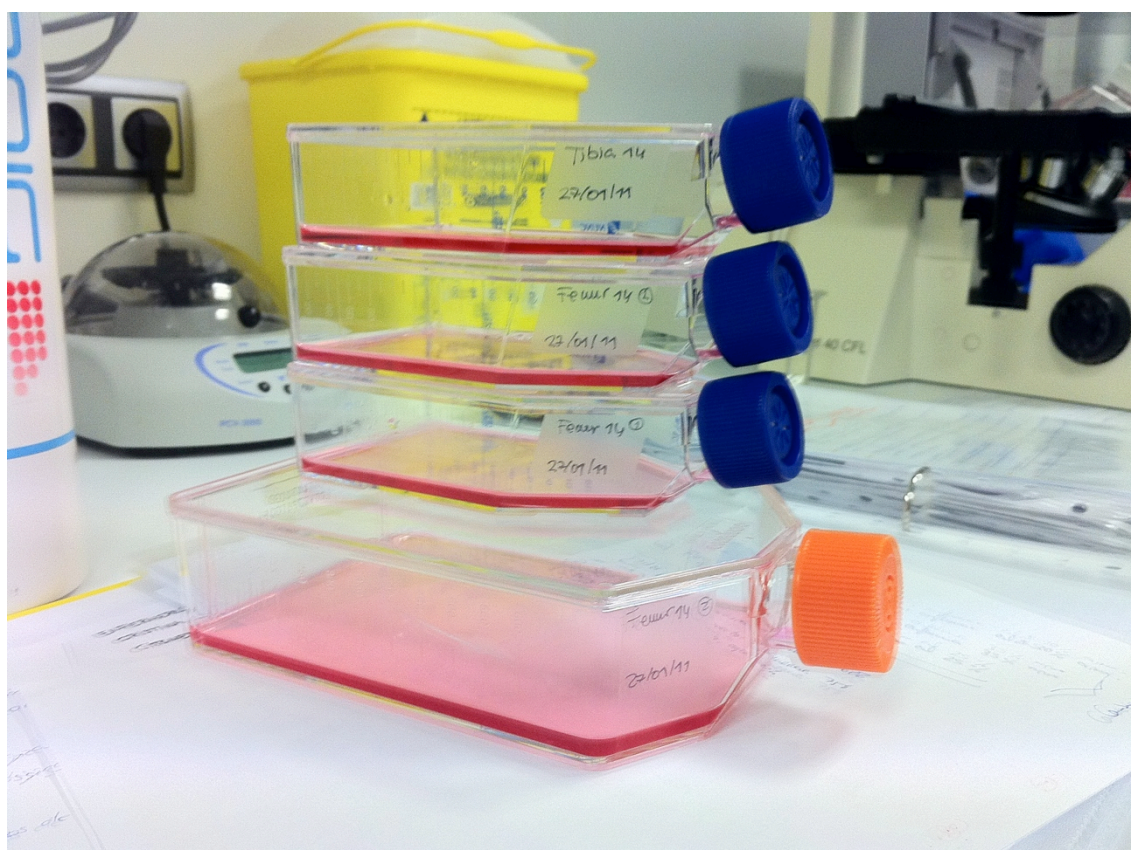
Las células mononucleadas se siembran en un frasco de cultivo con una densidad de 160.000 CMN/cm<sup>2</sup>. Dependiendo del número de células disponibles de cada muestra se emplean frascos de cultivo de diferentes tamaños y superficies.

El medio de cultivo es DMEM suplementado con glutamato, suero bovino fetal al 10%, y penicilina-estreptomicina al 1%. Los frascos de cultivo se introducen en una incubadora que los mantiene a 37°C con atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y humedad del 90%.

El cambio de medio se realiza cada 3 días. Para realizar el cambio de medio nos basamos en la propiedad de adherencia al plástico de las CTM. Por tanto,

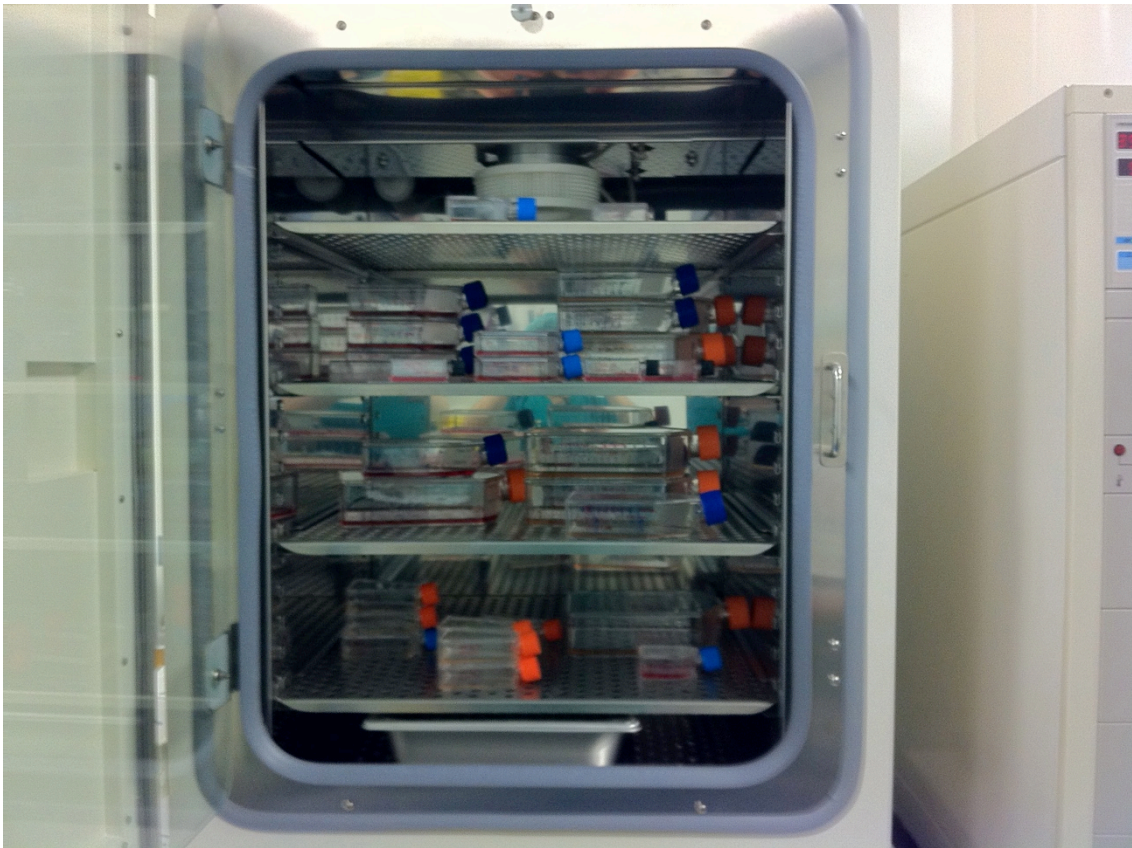
para realizar el cambio de medio simplemente se vacía el contenido retirando el tapón e inclinando el frasco de cultivo, quedando las células viables adheridas al suelo de plástico. A continuación se rellena de nuevo el frasco de cultivo con DMEM completo nuevo.

Con cada cambio de medio se eliminan las células en suspensión quedando en el cultivo únicamente las células con capacidad de adhesión al plástico. De este modo la muestra se va purificando quedando las CTM y una pequeña cantidad de otras células que también presentan capacidad de adhesión.



*Figura 16. Las CTM se mantienen en frasco de cultivo con DMEM. El tamaño del frasco de cultivo depende del número de células de la muestra y la superficie que pueden cubrir ( $160.000 \text{ cels/cm}^2$ ).*

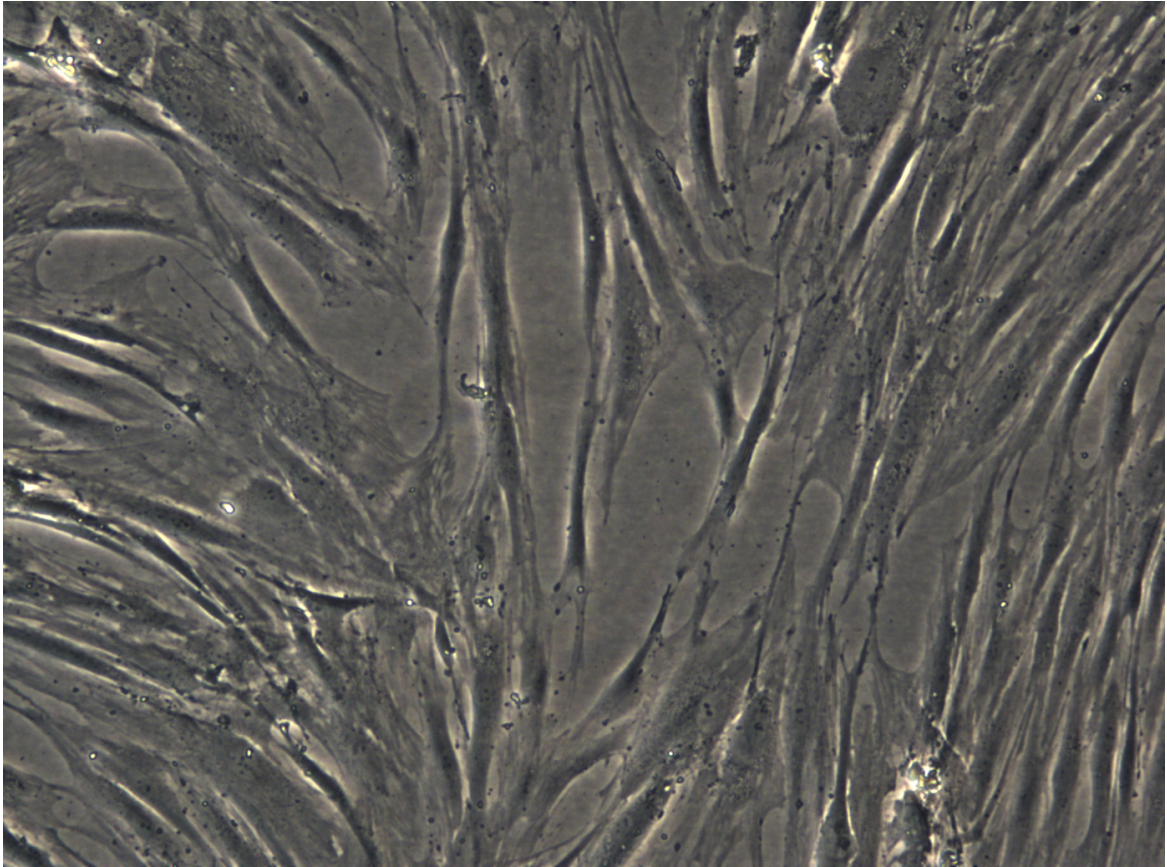




*Figura 17. Los cultivos se incuban a 37°C, en una atmósfera de 22°C y 90% de humedad.*

El cultivo se revisó semanalmente, visualizándolo en microscopio invertido y tomando una muestra para conteo celular y análisis de viabilidad en cámara de Neubauer.

La visualización directa del frasco de cultivo al microscopio permite identificar las células adheridas al plástico (presuntamente CTM) y células con forma esférica que se encuentran en suspensión en el medio de cultivo. Estas células en suspensión corresponden a células senescentes, muertas o de una estirpe sin capacidad de adhesión al plástico.



*Figura 18. Cultivo de CTM visualizado en microscopio invertido. Se observan las células adheridas a la superficie de plástico, adoptando una morfología parecida a la de los fibroblastos.*

Las células adherentes tapizan el suelo del frasco de cultivo de cultivo cubriendo una determinada superficie del mismo. Cuando las células alcanzan una confluencia de aproximadamente el 80% de la superficie del frasco de cultivo el cultivo se divide y se planta en nuevos frasco de cultivo. Esto se realiza para no frenar el crecimiento celular por falta de espacio y nutrientes. A este proceso se lo denomina comúnmente realizar un “pase”.



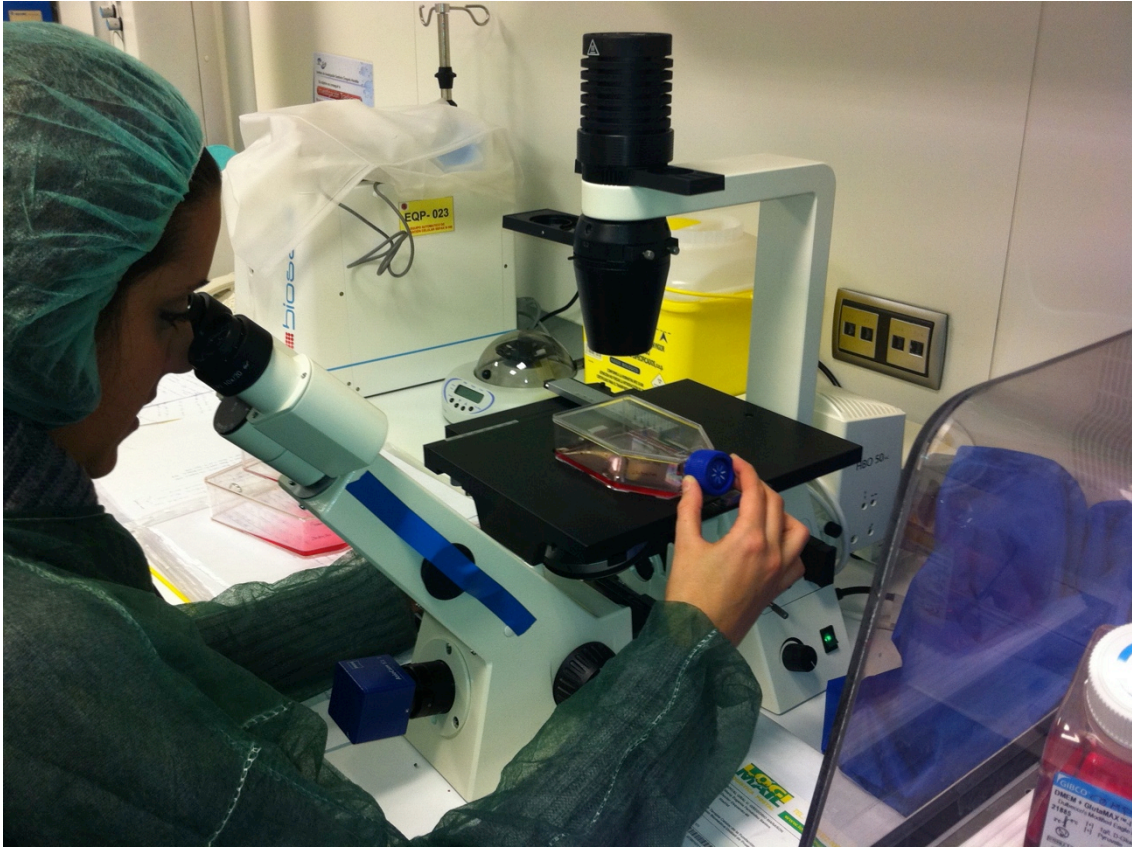


Figura 19. Visualización en microscopio invertido.

Para realizar un pase las células son resuspendidas eliminando las uniones adherentes al plástico mediante tripsinización.

Se realiza un lavado con PBS (Phosphate Buffered Saline, *Gibco® Life Technologies Corp.*) y agitación para eliminar restos de medio de cultivo y elementos celulares no deseados. A continuación, se añade TrypLE Select® (*Gibco® Life Technologies Corp.*) y se mantiene a temperatura ambiente durante 5-10 minutos. El TrypLE select es usado como sustituto de la tripsina, por ser ésta última de origen animal.

Se realiza un nuevo lavado con PBS y se añade DMEM completo, dividiendo la muestra en nuevos frascos de cultivo.

Para evitar la aparición de células con cambios mutagénicos no deseados los cultivos quedan restringidos a un máximo de 4 pases (que indicaría una expansión celular muy rápida y por tanto mayor probabilidad de aparición de cambios genéticos) o un tiempo máximo de cultivo de 6 semanas. En caso de no observar expansión del cultivo pasados unos días (senescencia, baja viabilidad celular o ausencia de adherencia al plástico) el cultivo se considera como fracaso y es desechado.

Al finalizar el período de cultivo la muestra se divide, tomando parte de las células para realizar caracterización mediante citometría y otra parte para someter dichas células a diferenciación hacia grasa, hueso y cartílago.

#### ***3.4.2 Caracterización de las CTM. Inmunofenotipo.***

Recordemos que los criterios mínimos de la ISCT que definen a una célula troncal mesenquimal son la adherencia al plástico, la expresión o carencia de determinados antígenos de membrana y la capacidad de diferenciación hacia grasa, hueso y cartílago (Dominici M et al. 2006).

La capacidad de adhesión de estas células se ha observado al microscopio durante el período de cultivo y expansión del mismo.

Finalizado el período de cultivo las células resultantes se obtienen de los frascos de cultivo y se divide cada muestra en dos partes. Una parte se

procesa para el análisis por citometría de flujo, y la otra parte se somete a estudio de potencialidad mediante la diferenciación a otros tejidos.

Dado que no existe un marcador específico que identifique a las CTM humanas la identificación de las CTM se realiza en base a la expresión o carencia de un conjunto determinado de proteínas de membrana. El fenotipo propuesto por la ISCT para las CTM es:

*-Presencia en más del 95% de las células del cultivo de:*

CD105, CD73 y CD90.

*-Negatividad (expresión en menos del 2% de las células del cultivo) de:*

CD45, CD34, CD14 ó CD11b, CD79 $\alpha$  ó CD19 y HLA-DR.

En este trabajo hemos realizado citometría para dichos marcadores y hemos investigado además la presencia de CD71, VEGF, CD106, CD117, CD133, CD184, y CD271, que han demostrado también su utilidad en otros trabajos para la identificación de las CTM (Buhring HJ et al. 2007; Buhring HJ et al. 2009; Tarnok A et al. 2010).

En la tabla 2 se realiza una breve reseña de la descripción o localización de cada marcador.



| Marcador | Otras Denominaciones | Presencia en las CTM | Descripción o localización.  |
|----------|----------------------|----------------------|--|
| CD3      |                      | -                    | Receptor de las Células T  |
| CD14     |                      | -                    | Coreceptor del lipopolisacárido bacteriano. Presente en Monocitos  |
| CD19     |                      | -                    | Células B  |
| CD31     | PECAM1, GPIIa        | -                    | Células endoteliales, plaquetas, monocitos, granulocitos, células B, megacariocitos, osteoclastos.                               |
| CD34     |                      | -                    | Células progenitoras hematopoyéticas.  |
| CD45     | PTPRC                | -                    | Células hematopoyéticas (Excepto eritrocitos) y HSCs.  |
| CD71     | TfR1                 | +                    | Receptor de transferrina: células en proliferación   |
| CD73     | ECTO 5' nucleotidasa | +                    | Subpoblaciones de células B y T  |
| CD90     | THY 1                | +                    | Subpoblación de células madre, células estromales del timo.  |
| CD105    | Endoglin             | +                    | Parte del receptor TGF- $\beta$ . Células endoteliales.  |
| CD106    | VCAM-1               | +                    | Molécula de adhesión celular vascular. Células endoteliales activadas.   |
| CD117    | Receptor-SCF, c-kit  | +/-                  | Receptor de citocinas. Células progenitoras. Promueve supervivencia, proliferación y diferenciación de las células progenitoras. |
| CD133    | AC-133               | +/-                  | Subpoblación células madre de estirpe endotelial.  |
| CD184    | CXCR4                | +                    | Quimiocina. Subpoblación de células T, células B, monocitos, dendríticas y endoteliales. Relacionado con migración celular.      |
| CD271    | NGFR                 | +                    | Receptor de baja afinidad para factor de crecimiento neural. Neuronas, células estromales, células foliculares dendríticas.      |
| VEGF     |                      | +                    | Factor de crecimiento vascular endotelial.   |
| HLA-DR   |                      | -                    | Antígeno humano de histocompatibilidad. NO se expresa en las CTM salvo que sean inducidas a ello.                                |

Tabla 2. Descripción de los marcadores empleados en la citometría para caracterización de CTM.

Para la detección de dichas proteínas de membrana se realizó análisis inmunofluorométrico. El procedimiento consiste en marcar las células con anticuerpos fijados a un fluorocromo. El citómetro realiza un recuento de las células que pasan una a una por delante de un láser. El citómetro registra la luz refractada por los fluorocromos conjugados a los diferentes anticuerpos que han reconocido los antígenos de membrana presentes en las células.

En el procedimiento las células son incubadas con los anticuerpos durante 10 minutos en oscuridad y lavadas con quicklysis (Quicklysis™, Cytognos S.L, España) con el fin de lisar los eritrocitos remanentes que podrían alterar el análisis y fijar los anticuerpos con que se han marcado las células.

Los anticuerpos con fluorocromos para los marcadores empleados son de la casa comercial Miltenyi Biotec. Los fluorocromos son FITC (Fluoresceína isotiocianato), PE (Ficoeritrina), PerCP (Peridina clorofila), y APC (Aloficocianina). Cada uno emite una fluorescencia de diferente color, detectada por el citómetro.

Para la adquisición se empleó un citómetro FACScalibur (BD Biosciences, San Jose, CA) y para el análisis de los resultados se empleó el programa informático *MACS Quantify*<sup>®</sup> (Miltenyi Biotec). La disposición de los test para las células marcadas por los anticuerpos se indica en la tabla 3.

| Tubos | FITC  | PE           | PERCP         | APC         |
|-------|---|--------------|---------------|-------------|
| 1     | <b>CONTROL</b><br>(Células NO marcadas con anticuerpos) |              |               |             |
| 2     | 106<br>10 µL  | VEGF<br>7 µL | 34<br>5 µL    | 184<br>7 µL |
| 3     | 117<br>7 µL   | 31<br>10 µL  | HLADR<br>7 µL | 271<br>6 µL |
| 4     | 105<br>10 µL  | 73<br>6 µL   | CD45          | 133<br>7 µL |
| 5     | 3<br>10 µL  | 14<br>10 µL  | *             | 19<br>6 µL  |
| 6     | 90<br>2 µL  | 71<br>10 µL  | *             | *           |

Tabla 3. Disposición de los anticuerpos fluorocromos en los diferentes tubos de ensayo para la citometría de cuatro colores.

El citómetro presenta los resultados en un diagrama de puntos donde se representa, por un lado, la “complejidad” o “granularidad” (SSC, side scatter, en el eje de ordenadas), frente a la intensidad de fluorescencia de los fluorocromos conjugados a los anticuerpos (en el eje de abscisas). En la

distribución de frecuencia de puntos (“*dot plots*”) cada punto representa a una partícula analizada, y la distribución de los puntos permite visualizar las contribuciones relativas de cada región de rangos de intensidad de fluorescencia.

Inicialmente se realiza una adquisición de células sin marcar. El motivo es determinar la autofluorescencia intrínseca de las células y, en base a este dato, establecer el punto de corte para determinar la positividad debida a la presencia de un marcador determinado.

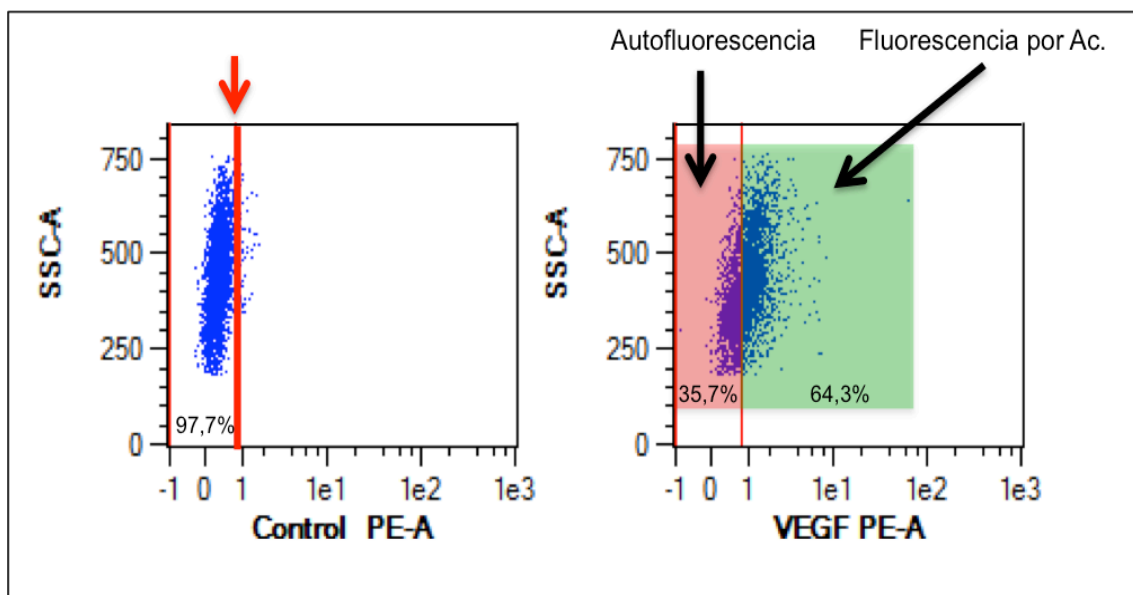


Figura 20. Calibración de la citometría. La muestra corresponde a las CTM de médula ósea de tibia del paciente n°19. A la izquierda se muestra el análisis de las células sin marcador al pasar por el láser detector de PE (Ficoeritrina). Se observa que aunque estén sin marcar el citómetro detecta cierto marcaje dada la refracción por su fluorescencia natural. La flecha roja indica el punto de corte a partir de el cual el láser no detecta marcaje. A la derecha se muestra el análisis de las células marcadas con ficoeritrina. El área verde (marcaje +) incluye las células que se estima que han sido detectadas por haber sido marcadas por los anticuerpos, mientras que el área roja fluorescencia natural, o autofluorescencia de las células sin marcaje.

### **3.4.3 Diferenciación de las CTM hacia grasa, hueso y cartílago**

Un requisito indispensable para poder definir a una célula como célula troncal mesenquimal es demostrar su capacidad de diferenciación, al menos, hacia grasa, hueso y cartílago.

Para ello, se indujo la diferenciación de las células troncales mesenquimales mediante su incubación en medios específicos. Los medios de inducción empleados son preparados comerciales de la casa Miltenyi Biotec (Alemania). Contienen DMEM, L-Glutamina, FBS (Suero Bovino Fetal) y los suplementos necesarios para inducir las células hacia un tejido u otro. A estos preparados comerciales se les añadió Penicilina-Estreptomicina al 1% para prevenir colonización bacteriana de los cultivos.

Los medios empleados fueron:

- NH-Osteodiff Medium: Para inducción hacia osteoblastos.
- NH- Adipodiff Medium: Para inducción hacia adipocitos.
- NH- Chondrodif Medium: Para inducción hacia condroblastos.

#### ***Diferenciación osteogénica***

Las células son resuspendidas en NH-Osteodiff Medium a una concentración de 30.000 cels/ml. Se transfieren 1,5 ml de la suspensión a un pocillo de 35 mm y a continuación se incuba la muestra a 37°C, con atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y 95% de humedad.

El medio se recambia cada 3 días retirando el NH osteodiff Medium y añadiendo 1,5 ml de medio fresco. Tras 10 días de cultivo, éste se detiene y se preparan las muestras para la detección de osteoblastos.

La detección de osteoblastos se realiza mediante tinción y visualización al microscopio. Para realizar la tinción se retira el medio de diferenciación y se lavan las células con PBS. A continuación se fijan las células añadiendo Isopropanol durante 30 minutos. La muestra se lava con agua destilada y se tiñe con Rojo Alizarina (Merck Millipore®, España) durante 2-4 minutos. La muestra se lava con agua destilada y se contratiñe con Hematoxilina (Merck Millipore®, España). Se realiza un nuevo lavado con agua corriente y finalmente un lavado con agua destilada.

A la visualización al microscopio los osteoblastos muestran una estructura cuboidal en estrecha relación con matriz ósea de nueva síntesis. En nuestro estudio consideramos como criterio de diferenciación ósea la presencia de depósitos granulares de calcio teñidos.

#### *Diferenciación adipogénica*

Las células son resuspendidas en NH Adipodiff Medium (precalentado a 37°C) a una concentración de 50.000 cls/ml. Se toman 1,5 ml de la suspensión y se transfieren a una placa de Petri de 35 mm. La muestra se incuba a 37°C, con atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y 95% de humedad.

El medio se cambia cada 3 días. Los adipocitos son células muy frágiles por lo que el proceso se ha de realizar cuidadosamente evitando pipetear directamente el medio sobre las células. En el día nº 21, el cultivo se detiene y se prepara para tinción.

La tinción de adipocitos se realiza retirando el medio de diferenciación y lavando las células en agitación con PBS durante 5 minutos dos veces. Las células se fijan con Metanol 5 min a temperatura ambiente. A continuación la muestra se lava dos veces con agua destilada durante 3 minutos.

La tinción se realiza con Rojo Aceite O (*Oil Red O*, Merck Millipore®, España) durante 20 minutos en agitación a temperatura ambiente. Para eliminar restos del tinte se lava la muestra dos veces con agua destilada durante 5 minutos.

Como criterio de diferenciación hacia adipocitos consideramos la visualización de células con grandes vacuolas de grasa lipídicas en su interior.

#### *Diferenciación condrogénica*

Para la diferenciación condrogénica se toma una muestra conteniendo 80.000 células. Dichas células se concentran en un pellet mediante centrifugación en tubo cónico durante 10 min a 1200 rpm. Se retira el sobrenadante y se resuspende el pellet celular en 5 µl de DMEM.

A continuación la muestra se introduce en un pocillo. En el pocillo contiguo se añade agua para crear una cámara húmeda y permitir el intercambio de gases que precisan las células. La placa de cultivo se introduce en la incubadora durante una hora (37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y humedad del 95%). Pasado este tiempo se añaden 0,5 ml de NH-Chondrodiff Medium y se introduce nuevamente en la incubadora.

El medio de diferenciación se recambia cada 3 días. En el día nº 14 el cultivo se detiene y se procesa para tinción y visualización al microscopio.

La tinción comienza retirando el medio de cultivo y lavando las células 3 veces con PBS y agitación. Las células se fijan con formalina al 10% durante 30 minutos. Se realizan 3 nuevos lavados con PBS y se tiñen con Azul de Toluidina (Sigma-Aldrich Química S.A, España) durante 1 a 5 minutos. Para finalizar se eliminan los restos de la tinción lavando abundantemente con agua corriente.

La visualización al microscopio revela la síntesis de abundante matriz extracelular. Dicha matriz se compone de proteoglicanos que son teñidos de color azul y son producidos por los condrocitos. La presencia de proteoglicanos es considerado el criterio de diferenciación condrogénica en nuestro estudio.

### 3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

#### 3.5.1 Variables de medición

El único dato demográfico tenido en cuenta para el análisis estadístico fue la edad. Para cada una de las muestras recogidas de Cresta, Fémur y Tibia se analizaron las siguientes variables:

- *Concentración CMN*: nº de células mononucleadas por cada ml de médula ósea.
- *Viabilidad CMN*: Viabilidad de las células mononucleadas analizado en cámara de Neubauer, expresado en porcentaje (%).
- *Plantadas*: Número de células mononucleadas (CMN) plantadas en un frasco al inicio del cultivo.
- *Nº final CTM*: número total de células troncales mesenquimales obtenidas al final del cultivo para cada muestra.
- *Viabilidad CTM*: Viabilidad de las células troncales mesenquimales al final del cultivo analizado en cámara de Neubauer, expresado en porcentaje (%).
- *Días de cultivo*: Número total de días que se ha mantenido una muestra en cultivo (máximo 42).
- *Éxito del cultivo*: Expresado en porcentaje. Cultivos que han completado el proceso hasta el final / cultivos desechados x 100.
- *Marcadores de membrana*: Análisis de la expresión celular de un determinado marcador de membrana realizado mediante técnicas de citometría de flujo. Dicho análisis se realizó en células de la médula ósea



pura sin seleccionar (expresado como Sangre Total, ST), de las células mononucleadas al final del cultivo (expresado como células mononucleadas, CM), y de las células troncales mesenquimales obtenidas al final de cada cultivo (utilizado para confirmar el tipo celular). La variable para cada marcador viene determinada por el nombre del marcador, el tipo de muestra entre paréntesis y la localización (cresta, fémur o tibia). Así por ejemplo, *CD34+ (ST) Fe*, hace referencia al marcador CD34 en las células de sangre total de fémur. El valor se representa en modo de porcentaje (% de células que expresan dicho marcador).

### ***3.5.2 Estadística descriptiva***

El estudio estadístico descriptivo se ha realizado caracterizando las variables continuas mediante estadísticos centrales (media, mediana) y de dispersión (desviación típica, rango y distribución por percentiles). Las variables categóricas se han descrito por medio de su distribución de frecuencias.

### ***3.5.3 Estadística inferencial***

Con independencia del supuesto de normalidad, se emplearon pruebas no paramétricas dado que el tamaño muestral resultaba ser menor de 20 elementos.

Para la comparación de las muestras entre sí se empleó el test de Wilcoxon como prueba no paramétrica, dado que las muestras proceden de una única población.

El nivel de significación para rechazar la hipótesis operativa se estableció en un valor de probabilidad “p” igual o menor de 0,05.

Para establecer el nivel de correlación entre dos variables continuas (siendo en este caso  $n < 20$ ) empleamos el test no paramétrico de la Rho de Spearman, ordenando los datos y reemplazándolos por su respectivo orden para calcular “p” (Rho).

Para el análisis estadístico se empleó el software SPSS 15 (IBM®) para Microsoft Windows.



## 4. RESULTADOS

La técnica para la obtención de las muestras demostró ser reproducible en todos los casos. Las referencias anatómicas de la rodilla para orientar la punción de fémur y tibia fueron fácilmente identificables incluso en pacientes obesos.

No se observaron complicaciones durante el proceso de toma de las muestras ni en el período postoperatorio (fallo del material quirúrgico, daño neurovascular, infección o hematoma). Únicamente reseñar que en un paciente no se pudo obtener médula ósea de tibia pese a haber realizado la técnica correctamente por motivos que aún desconocemos.

El dolor postoperatorio en la rodilla debido a la punción aspiración de médula ósea no pudo ser valorado dado el contexto quirúrgico del paciente, y por tanto es imposible determinar si el dolor es debido a la cirugía de reemplazo articular o por la punción. Ningún paciente requirió analgesia adicional por dolor en el punto de punción de cresta ilíaca. En cualquier caso los pacientes refirieron este dolor como leve o inexistente. No se observaron complicaciones (hematoma, lesión de nervio femorocutáneo, lesión vascular, infección) a nivel de cresta ilíaca.

Como se ha indicado previamente en tres pacientes la punción y aspiración de médula ósea de fémur y tibia se tomaron con el manguito de isquemia hinchado, violando el protocolo de recogida de muestras, por lo que fueron descartadas del estudio. En un paciente no se pudo obtener médula ósea tras punción aspiración de tibia por razones desconocidas.

Teniendo en cuenta estas pérdidas, al final del estudio se obtuvieron un total de 20 muestras de médula ósea de cresta ilíaca, 17 de metáfisis distal de fémur y 16 de metáfisis proximal de tibia.

Macroscópicamente, las muestras procedentes de fémur y tibia presentaron una menor viscosidad y un color más claro que las muestras de cresta ilíaca. Así mismo, las muestras de fémur y tibia presentaban un importante sobrenadante de grasa tras un período de reposo y tras la centrifugación (figura 21). Dicho sobrenadante graso fue eliminado previo al procesamiento de las muestras.

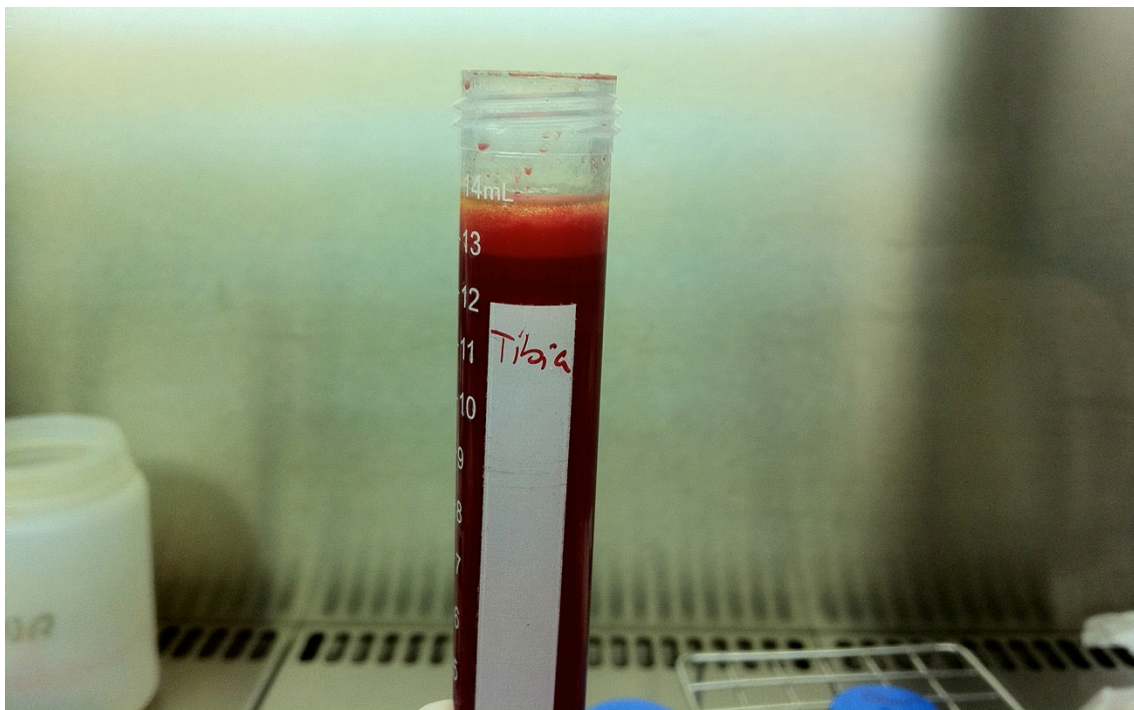


Fig. 21. Sobrenadante de grasa presente en una muestra de M.O de tibia.

## 4.1 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

### 4.1.1 Datos demográficos de la muestra

En la tabla 4 se pueden observar los datos descriptivos de la población del estudio. La población la componen 20 pacientes, 4 varones (20%) y 16 mujeres (80%), con edades comprendidas entre los 64 y 75 años, siendo la edad media 70,9 años (tabla 5).

En cada paciente se puncionó la cresta ilíaca, metáfisis femoral distal y metáfisis tibial proximal del mismo lado de la rodilla sometida a cirugía (8 lado derecho, 12 lado izquierdo).

| Paciente | Sexo V=1<br>M=2 | Edad | Rodilla<br>afectada | Hb (Gr/dL) | Hematíes<br>(10 <sup>6</sup> /mL) | Leucocitos<br>(10 <sup>3</sup> /mL) | Otros<br>criterios<br>exclusión |
|----------|-----------------|------|---------------------|------------|-----------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| 1        | 2               | 64   | Derecha             | 12,3       | 4,11                              | 12,3                                | no                              |
| 2        | 2               | 75   | Izquierda           | 10,9       | 3,63                              | 6,5                                 | no                              |
| 3        | 2               | 72   | Izquierda           | 13,3       | 4,56                              | 11,1                                | no                              |
| 4        | 1               | 65   | Izquierda           | 10,8       | 3,56                              | 8,4                                 | no                              |
| 5        | 2               | 71   | Derecha             | 12,1       | 3,89                              | 7,6                                 | no                              |
| 6        | 2               | 75   | Izquierda           | 12,4       | 3,65                              | 10,1                                | no                              |
| 7        | 2               | 69   | Izquierda           | 13,1       | 4,71                              | 14,8                                | no                              |
| 8        | 2               | 75   | Derecha             | 12,3       | 3,79                              | 9,3                                 | no                              |
| 9        | 1               | 65   | Derecha             | 11,1       | 3,71                              | 7,5                                 | no                              |
| 10       | 2               | 72   | Izquierda           | 11,9       | 3,69                              | 11,9                                | no                              |
| 11       | 2               | 67   | Izquierda           | 10,9       | 3,75                              | 8,3                                 | no                              |
| 12       | 1               | 74   | Derecha             | 13,6       | 4,14                              | 13,5                                | no                              |
| 13       | 2               | 75   | Izquierda           | 11,6       | 3,86                              | 16,5                                | no                              |
| 14       | 2               | 72   | Izquierda           | 12,3       | 4,05                              | 7,5                                 | no                              |
| 15       | 2               | 64   | Derecha             | 13,7       | 4,31                              | 9,4                                 | no                              |
| 16       | 1               | 75   | Izquierda           | 12,1       | 4,51                              | 6,2                                 | no                              |
| 17       | 2               | 70   | Izquierda           | 13,5       | 4,21                              | 5,6                                 | no                              |
| 18       | 2               | 75   | Derecha             | 12,4       | 3,65                              | 5,5                                 | no                              |
| 19       | 2               | 74   | Izquierda           | 14,2       | 4,55                              | 7,3                                 | no                              |
| 20       | 2               | 69   | Derecha             | 13,8       | 4,55                              | 5,1                                 | no                              |

Tabla 4. Datos demográficos de la muestra.

|      | N       |          | Media | Mediana | Desv. típ. | Mínimo  | Máximo   |
|------|---------|----------|-------|---------|------------|---------|----------|
|      | Válidos | Perdidos | 25    | 50      | 75         | Válidos | Perdidos |
| Edad | 20      | 0        | 70,9  | 72      | 4,051      | 64      | 75       |

Tabla 5. Análisis descriptivo de la edad de la población de estudio.

En las tablas 6-11 se describen los parámetros analizados de las muestras de médula ósea de las tres localizaciones y de las células troncales mesenquimales obtenidas tras cultivo.

#### 4.1.2 Estadísticos descriptivos de las muestras procedentes de cresta iliaca

|                           | N       |          | Media     | Mediana  | Desv. típ. | Mínimo  | Máximo    | Percentiles |          |           |
|---------------------------|---------|----------|-----------|----------|------------|---------|-----------|-------------|----------|-----------|
|                           | Válidos | Perdidos | 25        | 50       | 75         | Válidos | Perdidos  | 25          | 50       | 75        |
| Nº total CMN Cresta       | 20      | 0        | 127069500 | 34000000 | 190237228  | 750000  | 660000000 | 18300000    | 34000000 | 169375000 |
| Concentración CMN Cresta  | 20      | 0        | 10058871  | 2985714  | 14462809   | 136363  | 47619047  | 988333,3    | 2985714  | 14849823  |
| Viabilidad CMN (%) Cresta | 20      | 0        | 90,95     | 92,5     | 12,521     | 40      | 98        | 90          | 92,5     | 97,75     |
| Plantadas Cresta          | 20      | 0        | 4253000   | 1800000  | 7844247,7  | 180000  | 35000000  | 750000      | 1800000  | 4000000   |
| Nº final CTM Cresta       | 18      | 2        | 1278222,2 | 595000   | 2125067,9  | 20000   | 8800000   | 177000      | 595000   | 1195000   |
| Viabilidad CTM (%) Cresta | 20      | 0        | 79,95     | 92       | 31,019     | 0       | 98        | 84,25       | 92       | 96        |
| Días de cultivo Cresta    | 20      | 0        | 40        | 42       | 4,92       | 21      | 42        | 40,25       | 42       | 42        |

Tabla 6. Estadísticos descriptivos de las muestras procedentes de cresta iliaca

Como se puede observar en la tabla 6 se aprecian los distintos valores para nº total de CMN, que es el número total de células mononucleadas en la médula ósea total, sin procesar. Existe una gran variabilidad entre las muestras, con gran diferencia entre la media ( $127 \times 10^6$  CMN) y la mediana ( $34 \times 10^6$  CMN). Esto es debido a que en determinados pacientes el volumen de médula ósea extraído fue muy superior (hasta 30 ml) en lugar de los 5 ml mínimos establecidos para el estudio. La razón fue la solicitud por parte del laboratorio de terapia celular de extraer un volumen “extra” de médula ósea de cresta



ilíaca, con el fin de validar el instrumental y los aparatos de análisis y procesamiento celular de la sala blanca recientemente instalada en nuestra institución.

El parámetro fundamental analizado para cuantificar la densidad celular de la médula ósea fue la concentración celular, medido en CMN/ml de médula ósea.

La concentración de CMN/ml de M.O. presentó una media de  $10 \times 10^6$  CMN/ml, estando el percentil 25 en  $9,8 \times 10^5$  CMN/ml y percentil 75 en  $14,8 \times 10^6$  CMN/ml

La viabilidad de estas células expresada en porcentaje de células vivas presentó una media de 90,95% con escasa variabilidad entre las muestras.

El número medio de células mononucleadas de cresta ilíaca plantadas al inicio del cultivo fue una media de  $4,2 \times 10^6$  células.

Los datos expresados como n° final de CTM y viabilidad CTM hacen referencia a las células troncales mesenquimales obtenidas al final del proceso de cultivo y expansión, comprobada su naturaleza posteriormente con el inmunofenotipado y diferenciación.

N° final de CTM es el número total de células mesenquimales obtenidas al final del cultivo obtenido mediante conteo en cámara de Neubauer. Se observan 2 valores perdidos que corresponden a cultivos que fueron desechados por mala evolución de los mismos (muerte celular, senescencia). El n° final de CTM en cresta ilíaca presentó una media de  $1,2 \times 10^6$  células, una mediana de  $5,9 \times 10^5$ ,

estando el percentil 25 en  $1,7 \times 10^5$  y el percentil 75 en  $1,1 \times 10^6$ . Nuevamente se observa una gran dispersión entre los resultados.

La viabilidad de las CTM obtenidas al final del cultivo presentó una media de 79,5% de células vivas y una mediana de 92%.

Teniendo en cuenta los cultivos detenidos antes del tiempo máximo por haber completado el número máximo de pases, el tiempo medio de cultivo en cresta iliaca fue de 40 días. El éxito de los cultivos fue del 90%. (tabla 7) En 2 casos los cultivos fueron desechados por mala evolución.

**Éxito del cultivo Cresta**

|         |       | Frecuencia | Porcentaje | Porcentaje válido | Porcentaje acumulado |
|---------|-------|------------|------------|-------------------|----------------------|
| Válidos | No    | 2          | 10,0       | 10,0              | 10,0                 |
|         | Sí    | 18         | 90,0       | 90,0              | 100,0                |
|         | Total | 20         | 100,0      | 100,0             |                      |

*Tabla 7. Éxito de los cultivos de cresta iliaca.*

#### 4.1.3 Estadísticos descriptivos de metáfisis distal de fémur

|                          | N       |          | Media     | Mediana | Desv. típ. | Mínimo  | Máximo   | Percentiles |         |         |
|--------------------------|---------|----------|-----------|---------|------------|---------|----------|-------------|---------|---------|
|                          | Válidos | Perdidos | 25        | 50      | 75         | Válidos | Perdidos | 25          | 50      | 75      |
| Nº total CMN Fémur       | 17      | 3        | 4535588,2 | 2460000 | 8869137,1  | 25000   | 38000000 | 845000      | 2460000 | 3350000 |
| Concentración CMN Fémur  | 17      | 3        | 674650,41 | 400000  | 1171490,3  | 4166    | 5066666  | 158408      | 400000  | 682258  |
| Viabilidad CMN (%) Fémur | 17      | 3        | 81,18     | 87      | 18,918     | 40      | 98       | 81,5        | 87      | 91,5    |
| Plantadas Fémur          | 17      | 3        | 3380882,4 | 960000  | 8233839,9  | 25000   | 35000000 | 435000      | 960000  | 2700000 |
| Nº final CTM Fémur       | 12      | 8        | 543000    | 290500  | 669054,01  | 20000   | 2043000  | 127500      | 290500  | 587500  |
| Viabilidad CTM (%) Fémur | 14      | 6        | 71,21     | 83      | 33,361     | 0       | 98       | 64          | 83      | 92,5    |
| Días de cultivo Fémur    | 17      | 3        | 34,29     | 38      | 10,861     | 12      | 42       | 28          | 38      | 42      |

Tabla 8. Estadísticos descriptivos de metáfisis distal de fémur

En la columna de valores perdidos se puede observar un valor constante de 3 casos. Estos casos fueron los retirados del estudio por haber realizado la obtención de las muestras en contra del protocolo de extracción.

En la variable *Nº final de CTM fémur* se observan 8 pérdidas. Tres corresponden a los casos mencionados previamente. Las cinco restantes corresponden a cultivos desechados a lo largo del proceso por observar mala evolución.

En la variable *Viabilidad CTM (%) fémur* se observan 6 pérdidas. Tres corresponden a los casos desechados de inicio, y las restantes corresponden a casos con mala evolución en los que no se analizó la viabilidad celular antes de desecharlos.

El número total de células mononucleadas en la médula ósea de metáfisis distal de fémur presentó una media de  $4,5 \times 10^6$  CMN y una mediana de  $2,4 \times 10^6$  CMN.

La concentración de CMN/ml de M.O en fémur distal presentó una media de  $6,7 \times 10^5$  CMN/ml , estando el percentil 25 en  $1,5 \times 10^5$  CMN/ml y percentil 75 en  $6,8 \times 10^5$  CMN/ml.

La viabilidad de estas células presentó una media de 81,8% y una mediana de 87%. El número medio de células mononucleadas de fémur distal plantadas al inicio del cultivo fue una media de  $3,3 \times 10^6$  células.

El nº final de CTM en fémur distal presentó una media de  $5,4 \times 10^5$  células, una mediana de  $2,9 \times 10^5$ , estando el percentil 25 en  $1,2 \times 10^5$  y el percentil 75 en  $5,8 \times 10^5$ . La viabilidad de las CTM obtenidas de médula ósea de fémur distal al final del cultivo presentó una media de 71,21% de células vivas y una mediana de 83%.

Teniendo en cuenta los cultivos detenidos antes del tiempo máximo por haber completado el número máximo de pases y los cultivos detenidos por mala evolución, el tiempo medio de cultivo en metáfisis distal de fémur fue de 34,2 días.

El éxito de los cultivos de fémur fue del 70,6%. (tabla 9) En cinco casos los cultivos fueron desechados por mala evolución.

### Éxito del cultivo Fémur

|          |         | Frecuencia | Porcentaje | Porcentaje válido | Porcentaje acumulado |
|----------|---------|------------|------------|-------------------|----------------------|
| Válidos  | No      | 5          | 25,0       | 29,4              | 29,4                 |
|          | Sí      | 12         | 60,0       | 70,6              | 100,0                |
|          | Total   | 17         | 85,0       | 100,0             |                      |
| Perdidos | Sistema | 3          | 15,0       |                   |                      |
| Total    |         | 20         | 100,0      |                   |                      |

*Tabla 9. Éxito de los cultivos de metáfisis distal de fémur.*

#### 4.1.4 Estadísticos descriptivos de metáfisis proximal de tibia

|                          | N       |          | Media     | Mediana | Desv. típ. | Mínimo  | Máximo    | Percentiles |         |           |
|--------------------------|---------|----------|-----------|---------|------------|---------|-----------|-------------|---------|-----------|
|                          | Válidos | Perdidos | 25        | 50      | 75         | Válidos | Perdidos  | 25          | 50      | 75        |
| Nº total CMN Tibia       | 16      | 4        | 13118750  | 1900000 | 36799843   | 470000  | 150000000 | 1067500     | 1900000 | 9125000   |
| Concentración CMN Tibia  | 16      | 4        | 1747770,3 | 261904  | 4895113,8  | 52222   | 20000000  | 168303,5    | 261904  | 1123528,8 |
| Viabilidad CMN (%) Tibia | 16      | 4        | 83,63     | 85      | 10,301     | 65      | 98        | 74,25       | 85      | 92,75     |
| Plantadas Tibia          | 16      | 4        | 3493750   | 995000  | 8471557,8  | 180000  | 35000000  | 540000      | 995000  | 2000000   |
| Nº final CTM Tibia       | 8       | 12       | 411687,5  | 325000  | 266031,54  | 36000   | 790000    | 242500      | 325000  | 715625    |
| Viabilidad CTM (%) Tibia | 8       | 12       | 83,63     | 83,5    | 11,649     | 61      | 98        | 78,5        | 83,5    | 93,25     |
| Días de cultivo Tibia    | 16      | 4        | 31,88     | 37      | 11,96      | 9       | 42        | 20,25       | 37      | 42        |

Tabla 10. Estadísticos descriptivos de metáfisis proximal de tibia.

En la columna de valores perdidos se puede observar un valor constante de 4 casos. Tres de éstas pérdidas corresponden a los casos retirados del estudio por haber violado el protocolo de extracción. Una de las pérdidas corresponde al caso en que no fue posible obtener médula ósea pese a haber realizado la técnica correctamente.

En las variables *Nº final de CTM tibia* y *Viabilidad CTM (%) tibia* se observan 12 pérdidas. Cuatro pérdidas corresponden a los casos mencionados previamente, y las ocho pérdidas restantes corresponden a cultivos desechados a lo largo del proceso por observar mala evolución.

El número total de células mononucleadas en la médula ósea de metáfisis proximal de tibia presentó una media de  $13,1 \times 10^6$  CMN y una mediana de  $1,9 \times 10^6$  CMN. Se observa una gran dispersión de los valores, estando el percentil 25 en  $1,06 \times 10^6$  y el percentil 75 en  $9,1 \times 10^6$ .

La concentración de CMN/ml de M.O en tibia proximal presentó una media de  $1,7 \times 10^6$  CMN/ml , estando el percentil 25 en  $1,6 \times 10^5$  CMN/ml y percentil 75 en  $1,1 \times 10^6$  CMN/ml.

La viabilidad de estas células presentó una media de 83,6% y una mediana de 85%. El número medio de células mononucleadas de tibia proximal plantadas al inicio del cultivo fue una media de  $3,49 \times 10^6$  células.

El nº final de CTM en tibia proximal presentó una media de  $4,1 \times 10^5$  células, una mediana de  $3,2 \times 10^5$ , estando el percentil 25 en  $2,4 \times 10^5$  y el percentil 75 en  $7,1 \times 10^5$ . La viabilidad de las CTM obtenidas de médula ósea de tibia proximal al final del cultivo presentó una media de 83,6% de células vivas y una mediana de 83,5%.

Teniendo en cuenta los cultivos detenidos antes de tiempo, por haber completado el número máximo de pases y otros por mala evolución, el tiempo medio de cultivo en metáfisis proximal de tibia fue de 31,8 días.

El éxito de los cultivos de tibia fue del 50%. (tabla 11) En ocho casos los cultivos fueron desechados por mala evolución.

Éxito del cultivo Tibia

|          |         | Frecuencia | Porcentaje | Porcentaje válido | Porcentaje acumulado |
|----------|---------|------------|------------|-------------------|----------------------|
| Válidos  | No      | 8          | 40,0       | 50,0              | 50,0                 |
|          | Sí      | 8          | 40,0       | 50,0              | 100,0                |
|          | Total   | 16         | 80,0       | 100,0             |                      |
| Perdidos | Sistema | 4          | 20,0       |                   |                      |
| Total    |         | 20         | 100,0      |                   |                      |

Tabla 11. Éxito de los cultivos de metáfisis proximal de tibia.

Se puede observar una representación gráfica comparativa mediante diagrama de cajas de las variables *concentración CMN* y *nº final de CTM* en las gráficas 1 y 2.

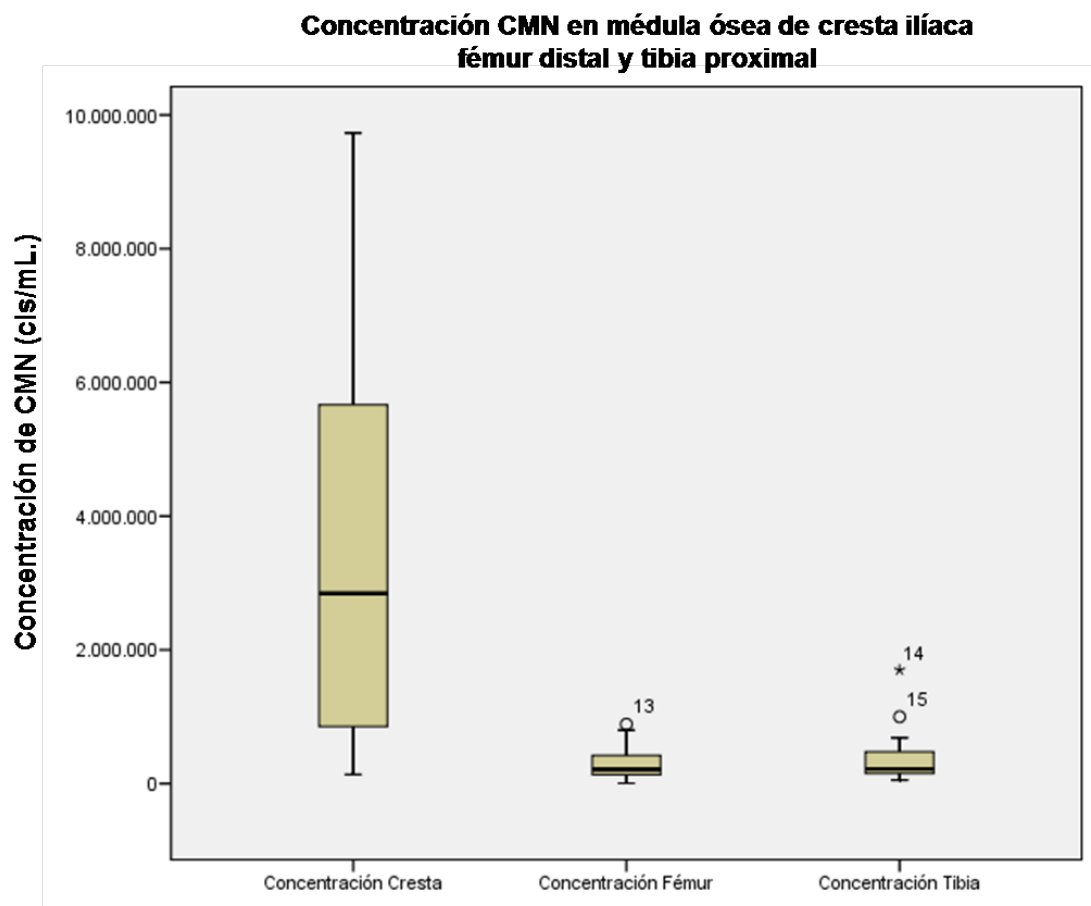


Gráfico 1. Diagrama de cajas representando la concentración de CMN para cresta iliaca, fémur distal y tibia proximal.



### Nº total de CTM obtenidas al final del cultivo en cresta, fémur y tibia

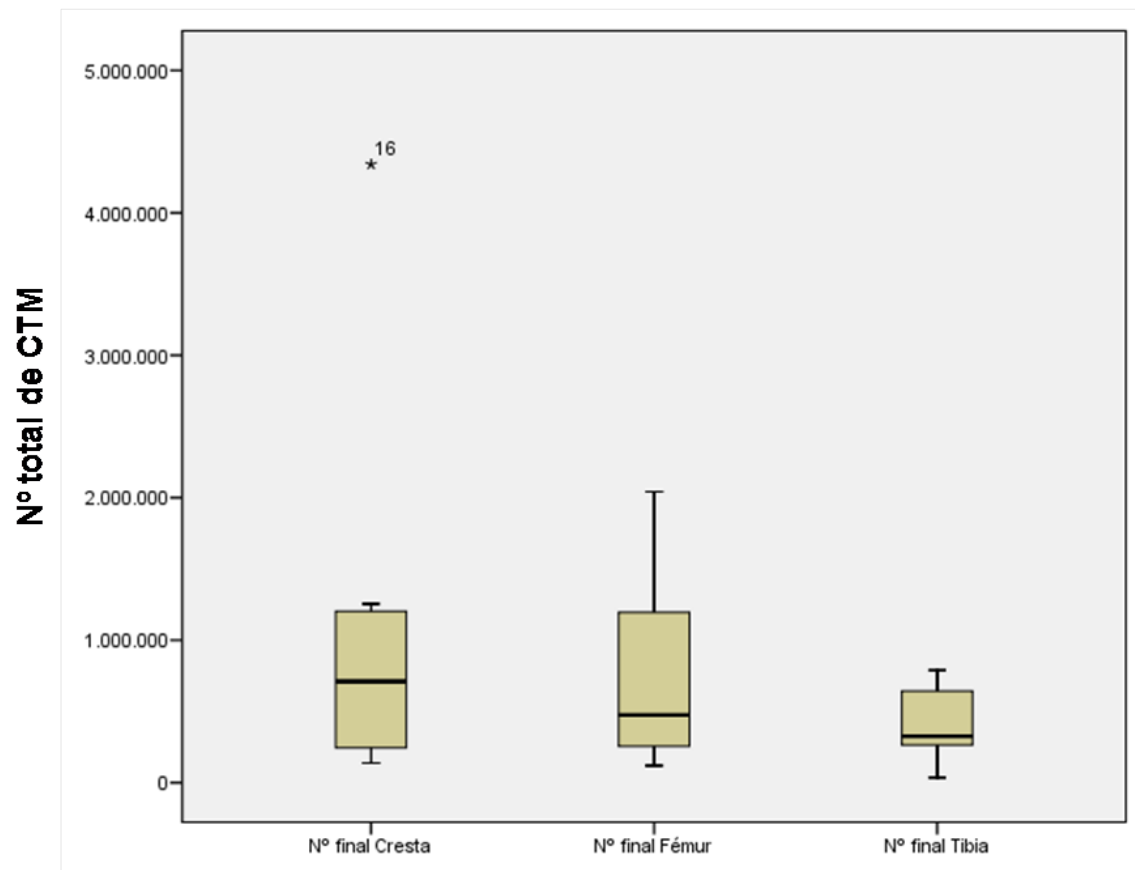


Gráfico 2 Diagrama de cajas representando el nº final de CTM obtenidas al final del cultivo para cresta iliaca, fémur distal y tibia proximal.

#### 4.1.5 Estadísticos descriptivos del análisis inmunofenotípico

Recordemos que a lo largo del proceso se realizaron tres análisis; el primero se realizó sobre médula ósea sin procesar (sangre total), el segundo se realizó sobre las CMN previo al inicio del cultivo, y el último se realizó sobre las CTM obtenidas al final del proceso:

- **Sangre total (ST):** Incluye todas las células presentes en la muestra inicial de médula ósea de las tres localizaciones, para cada paciente, previo a los cultivos. Son las células que componen la población celular de la médula ósea e incluyen precursores hematopoyéticos, células de la serie blanca y células troncales mesenquimales entre otras. Esta muestra se denomina “sangre total”, expresado con las siglas ST. Se analizan los marcadores CD34, CD133, CD117 y CD14.

- **Células mononucleadas (CM):** se realiza sobre las células mononucleadas aisladas de la muestra de médula ósea previo al inicio de los cultivos. Se analizan los marcadores CD34, CD133, CD117, CD14, CD3, CD90, CD106, CD 105, VEGF, CD 31, CD 73, CD 71, CD 184 y CD 271.

- **Células troncales mesenquimales (CTM):** se realiza sobre las células troncales mesenquimales obtenidas tras los cultivos de expansión. Se analizan los marcadores CD34, CD133, CD117, CD14, CD90, CD 105, VEGF, CD 31, CD 73 y CD 71.

En las siguientes tablas se muestran los valores descriptivos para los marcadores empleados en el análisis de las células por citometría de flujo.

En las tablas presentadas las variables para cada marcador vienen representadas con el nombre del marcador, el tipo de muestra expresado entre paréntesis y el origen de la muestra:

-*Tipo de muestra*: Sangre total (ST), células mononucleadas (CM).

-*Origen de la muestra*: cresta, (Cr), fémur (Fe) o tibia (Ti).

Así por ejemplo la variable *CD34+(CM)Cr*, hace referencia al análisis de la positividad para el marcador hematopoyético CD34 de las células mononucleadas procedentes de cresta ilíaca. El valor de la variable hace referencia al porcentaje de células que presentan positividad para dicho marcador.

En las tablas se aprecian valores perdidos. Esto es debido a que en la mayor parte de los casos la muestra al final del estudio resultó ser insuficiente para poder realizar un análisis completo de todos los marcadores.

#### 4.1.6 Análisis citométrico de la médula ósea.

##### Fenotipo para sangre total (M.O) de cresta ilíaca

|                 | N       |          | Media  | Mediana | Desv. típ. | Mínimo | Máximo | Percentiles |       |        |
|-----------------|---------|----------|--------|---------|------------|--------|--------|-------------|-------|--------|
|                 | Válidos | Perdidos |        |         |            |        |        | 25          | 50    | 75     |
| CD 34+ (ST) Cr  | 14      | 6        | 2,8864 | 1,005   | 6,61668    | 0,42   | 25,8   | 0,685       | 1,005 | 1,8325 |
| CD 133+ (ST) Cr | 13      | 7        | 0,9869 | 0,69    | 0,85682    | 0,26   | 3,45   | 0,48        | 0,69  | 1,265  |
| CD 117+ (ST) Cr | 14      | 6        | 1,4343 | 1,33    | 0,69721    | 0,32   | 2,99   | 0,95        | 1,33  | 1,95   |
| CD 14+ (ST) Cr  | 9       | 11       | 4,2311 | 3,12    | 1,83777    | 2,48   | 7,3    | 2,94        | 3,12  | 6,04   |

Tabla 12. Citometría para las células presentes en médula ósea de cresta ilíaca.

##### Fenotipo para sangre total (M.O) de fémur

|                 | N       |          | Media  | Mediana | Desv. típ. | Mínimo | Máximo | Percentiles |       |       |
|-----------------|---------|----------|--------|---------|------------|--------|--------|-------------|-------|-------|
|                 | Válidos | Perdidos |        |         |            |        |        | 25          | 50    | 75    |
| CD 34+ (ST) Fe  | 13      | 7        | 0,6015 | 0,54    | 0,52067    | 0,03   | 1,55   | 0,11        | 0,54  | 1,105 |
| CD 133+ (ST) Fe | 10      | 10       | 0,47   | 0,16    | 0,545      | 0      | 1      | 0           | 0,16  | 1     |
| CD 117+ (ST) Fe | 12      | 8        | 0,8775 | 0,39    | 1,04161    | 0,05   | 3,21   | 0,1575      | 0,39  | 1,45  |
| CD 14+ (ST) Fe  | 6       | 14       | 5,4367 | 5,435   | 1,72601    | 2,63   | 7,57   | 4,2725      | 5,435 | 6,94  |

Tabla 13. Citometría para las células presentes en médula ósea de fémur.

##### Fenotipo para sangre total (M.O) de tibia

|                 | N       |          | Media | Mediana | Desv. típ. | Mínimo | Máximo | Percentiles |      |      |
|-----------------|---------|----------|-------|---------|------------|--------|--------|-------------|------|------|
|                 | Válidos | Perdidos |       |         |            |        |        | 25          | 50   | 75   |
| CD 34+ (ST) Ti  | 9       | 11       | 0,38  | 0,22    | 0,434      | 0      | 1      | 0,02        | 0,22 | 0,89 |
| CD 133+ (ST) Ti | 8       | 12       | 0,22  | 0,05    | 0,362      | 0      | 1      | 0,01        | 0,05 | 0,47 |
| CD 117+ (ST) Ti | 9       | 11       | 0,48  | 0,21    | 0,6        | 0      | 2      | 0,09        | 0,21 | 0,94 |
| CD 14+ (ST) Ti  | 5       | 15       | 5,374 | 4,45    | 1,63807    | 3,79   | 7,65   | 4,12        | 4,45 | 7,09 |

Tabla 14. Citometría para las células presentes en médula ósea de tibia.

#### 4.1.7 Análisis citométrico de las CMN

##### Fenotipo de las CMN de cresta iliaca

|                 | N       |          | Media  | Mediana | Desv. típ. | Mínimo | Máximo | Percentiles |       |        |
|-----------------|---------|----------|--------|---------|------------|--------|--------|-------------|-------|--------|
|                 | Válidos | Perdidos |        |         |            |        |        | 25          | 50    | 75     |
| CD 34+ (CM) Cr  | 13      | 7        | 0,9692 | 0,86    | 0,42502    | 0,25   | 1,65   | 0,64        | 0,86  | 1,41   |
| CD 133+ (CM) Cr | 14      | 6        | 0,2471 | 0,06    | 0,29906    | 0      | 0,8    | 0           | 0,06  | 0,5575 |
| CD 117+ (CM) Cr | 13      | 7        | 0,7846 | 0,45    | 0,79985    | 0      | 2,13   | 0,11        | 0,45  | 1,585  |
| CD 3+ (CM) Cr   | 14      | 6        | 3,7271 | 2,4     | 3,42922    | 0      | 11,92  | 1,6625      | 2,4   | 5,575  |
| CD 14+ (CM) Cr  | 14      | 6        | 5,6343 | 5       | 3,73423    | 0,12   | 12,74  | 3,5425      | 5     | 7,3975 |
| CD 90+ (CM) Cr  | 14      | 6        | 0,2136 | 0,16    | 0,28476    | 0      | 1,01   | 0,0075      | 0,16  | 0,245  |
| CD106+ (CM) Cr  | 11      | 9        | 0,15   | 0,05    | 0,229      | 0      | 1      | 0           | 0,05  | 0,28   |
| CD 105+ (CM) Cr | 14      | 6        | 0,6586 | 0,405   | 0,72943    | 0,02   | 2,83   | 0,2         | 0,405 | 1,0375 |
| VEGF + (CM) Cr  | 12      | 8        | 0,86   | 0,18    | 1,77       | 0      | 6      | 0           | 0,18  | 0,68   |
| CD 31+ (CM) Cr  | 13      | 7        | 2,4308 | 0,53    | 4,02193    | 0,12   | 12,99  | 0,19        | 0,53  | 3,825  |
| CD 73+ (CM) Cr  | 14      | 6        | 1,6064 | 0,665   | 3,08156    | 0,03   | 11,98  | 0,4725      | 0,665 | 0,965  |
| CD 71+ (CM) Cr  | 13      | 7        | 1,3238 | 0,79    | 1,88312    | 0      | 7,29   | 0,38        | 0,79  | 1,51   |
| CD 184+ (CM) Cr | 13      | 7        | 0,8431 | 0,54    | 0,76704    | 0,01   | 2,26   | 0,245       | 0,54  | 1,345  |
| CD 271+ (CM) Cr | 11      | 9        | 0,3882 | 0,38    | 0,29386    | 0      | 1,1    | 0,16        | 0,38  | 0,52   |

Tabla 15. Citometría para las células mononucleadas obtenidas a partir de médula ósea de cresta iliaca.

##### Fenotipo de las CMN de metáfisis distal de fémur

|                 | N       |          | Media  | Mediana | Desv. típ. | Mínimo | Máximo | Percentiles |       |        |
|-----------------|---------|----------|--------|---------|------------|--------|--------|-------------|-------|--------|
|                 | Válidos | Perdidos |        |         |            |        |        | 25          | 50    | 75     |
| CD 34+ (CM) Fe  | 10      | 10       | 0,659  | 0,465   | 0,6009     | 0,06   | 1,78   | 0,1575      | 0,465 | 1,1225 |
| CD 133+ (CM) Fe | 11      | 9        | 0,1127 | 0,01    | 0,16823    | 0      | 0,43   | 0           | 0,01  | 0,22   |
| CD 117+ (CM) Fe | 11      | 9        | 0,3745 | 0,18    | 0,45566    | 0      | 1,54   | 0,06        | 0,18  | 0,63   |
| CD 3+ (CM) Fe   | 11      | 9        | 6,6073 | 3,63    | 6,93997    | 0,57   | 21,25  | 1,71        | 3,63  | 12,75  |
| CD 14+ (CM) Fe  | 11      | 9        | 4,9491 | 3,51    | 3,65394    | 0,65   | 13,3   | 2,58        | 3,51  | 6,28   |
| CD 90+ (CM) Fe  | 10      | 10       | 0,16   | 0,13    | 0,229      | 0      | 1      | 0           | 0,13  | 0,19   |
| CD106+ (CM) Fe  | 8       | 12       | 0,09   | 0,06    | 0,099      | 0      | 0      | 0           | 0,06  | 0,19   |
| CD 105+ (CM) Fe | 11      | 9        | 0,09   | 0       | 0,129      | 0      | 0      | 0           | 0     | 0,14   |
| VEGF + (CM) Fe  | 9       | 11       | 0,6222 | 0,31    | 1,04219    | 0,05   | 3,32   | 0,075       | 0,31  | 0,665  |
| CD 31+ (CM) Fe  | 11      | 9        | 1,7982 | 0,56    | 2,78052    | 0,02   | 9      | 0,13        | 0,56  | 1,98   |
| CD 73+ (CM) Fe  | 10      | 10       | 1,409  | 1,51    | 1,05148    | 0,11   | 3,46   | 0,36        | 1,51  | 2,015  |
| CD 71+ (CM) Fe  | 10      | 10       | 0,559  | 0,46    | 0,58578    | 0      | 2,09   | 0,2025      | 0,46  | 0,6125 |
| CD 184+ (CM) Fe | 9       | 11       | 1,5378 | 0,24    | 3,09217    | 0      | 9,65   | 0,18        | 0,24  | 1,375  |
| CD 271+ (CM) Fe | 11      | 9        | 0,2655 | 0,12    | 0,34189    | 0      | 1,04   | 0           | 0,12  | 0,57   |

Tabla 16. Citometría para las células mononucleadas obtenidas a partir de médula ósea de fémur.

**Fenotipo de las CMN de metáfisis proximal de tibia**

|                 | N       |          | Media  | Mediana | Desv. típ. | Mínimo | Máximo | Percentiles |       |        |
|-----------------|---------|----------|--------|---------|------------|--------|--------|-------------|-------|--------|
|                 | Válidos | Perdidos |        |         |            |        |        | 25          | 50    | 75     |
| CD 34+ (CM) Ti  | 9       | 11       | 0,2778 | 0,08    | 0,34354    | 0      | 0,86   | 0           | 0,08  | 0,63   |
| CD 133+ (CM) Ti | 10      | 10       | 0,05   | 0,03    | 0,055      | 0      | 0      | 0           | 0,03  | 0,12   |
| CD 117+ (CM) Ti | 10      | 10       | 0,239  | 0,07    | 0,38616    | 0      | 1,19   | 0           | 0,07  | 0,3325 |
| CD 3+ (CM) Ti   | 10      | 10       | 8,494  | 5,49    | 10,38073   | 0      | 35,19  | 1,4325      | 5,49  | 11,57  |
| CD 14+ (CM) Ti  | 10      | 10       | 4,886  | 4,055   | 3,5568     | 0,7    | 11,1   | 1,868       | 4,055 | 8,043  |
| CD 90+ (CM) Ti  | 10      | 10       | 0,529  | 0,135   | 1,12302    | 0,03   | 3,71   | 0,11        | 0,135 | 0,3225 |
| CD106+ (CM) Ti  | 9       | 11       | 0,1456 | 0,14    | 0,13039    | 0      | 0,36   | 0,03        | 0,14  | 0,26   |
| CD 105+ (CM) Ti | 10      | 10       | 0,3    | 0       | 0,609      | 0      | 2      | 0           | 0     | 0,44   |
| VEGF + (CM) Ti  | 9       | 11       | 1,0889 | 0,35    | 2,02947    | 0,02   | 6,41   | 0,095       | 0,35  | 1      |
| CD 31+ (CM) Ti  | 10      | 10       | 2,985  | 1,63    | 3,34064    | 0,04   | 8,49   | 0,0825      | 1,63  | 6,17   |
| CD 73+ (CM) Ti  | 10      | 10       | 1,562  | 0,855   | 1,77339    | 0,36   | 5,87   | 0,4         | 0,855 | 2,1875 |
| CD 71+ (CM) Ti  | 10      | 10       | 1,53   | 0,25    | 3,2702     | 0,1    | 10,6   | 0,16        | 0,25  | 1,028  |
| CD 184+ (CM) Ti | 9       | 11       | 0,259  | 0,11    | 0,3586     | 0      | 1,1    | 0,035       | 0,11  | 0,36   |
| CD 271+ (CM) Ti | 10      | 10       | 0,21   | 0,14    | 0,256      | 0      | 1      | 0,01        | 0,14  | 0,31   |

Tabla 17. Citometría para las células mononucleadas obtenidas a partir de médula ósea de tibia.

#### **4.1.8 Análisis citométrico de las CTM**

El análisis de las células troncales mesenquimales se realizó para determinar si éstas presentan expresión positiva o no de los marcadores elegidos. De este modo se determina si son ó no CTM. Por ello los datos no se presentan en una tabla de valores de frecuencia sino que se recogió la expresión negativa o positiva para los marcadores a partir de las gráficas de diagrama de puntos proporcionadas por el citómetro.

En los diagramas el eje de ordenadas expresa la granularidad expresada y el eje de abscisas la intensidad de fluorescencia detectada por el citómetro.

Se observó que las CTM procedentes de cresta ilíaca, fémur distal y tibia proximal presentaban un patrón fenotípico similar, siendo negativos para marcadores hematopoyéticos como: CD34 , CD45, CD14, CD19, CD117 y CD133, así como para HLA-DR y positivas para CD73, CD71, CD105+, CD90 y VEGF.

A modo de ejemplo se representan los citogramas para las muestras de cresta, fémur y tibia del paciente nº 19 (Gráficos 3-8).

## CRESTA ILÍACA

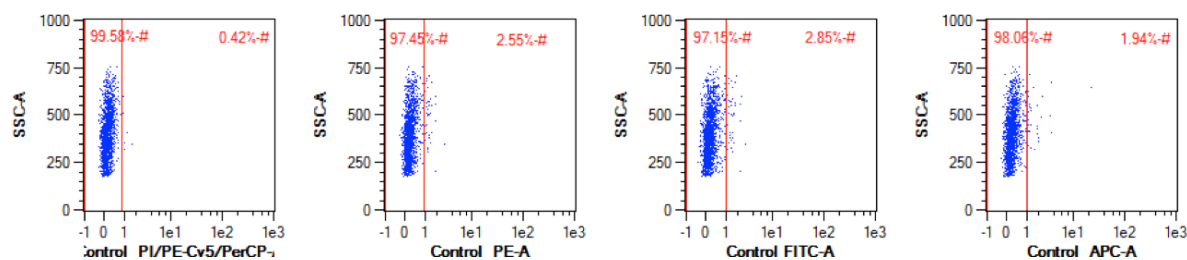


Gráfico 3. Ejemplo de citometría de control de autofluorescencia para CTM de cresta ilíaca, paciente n°19.

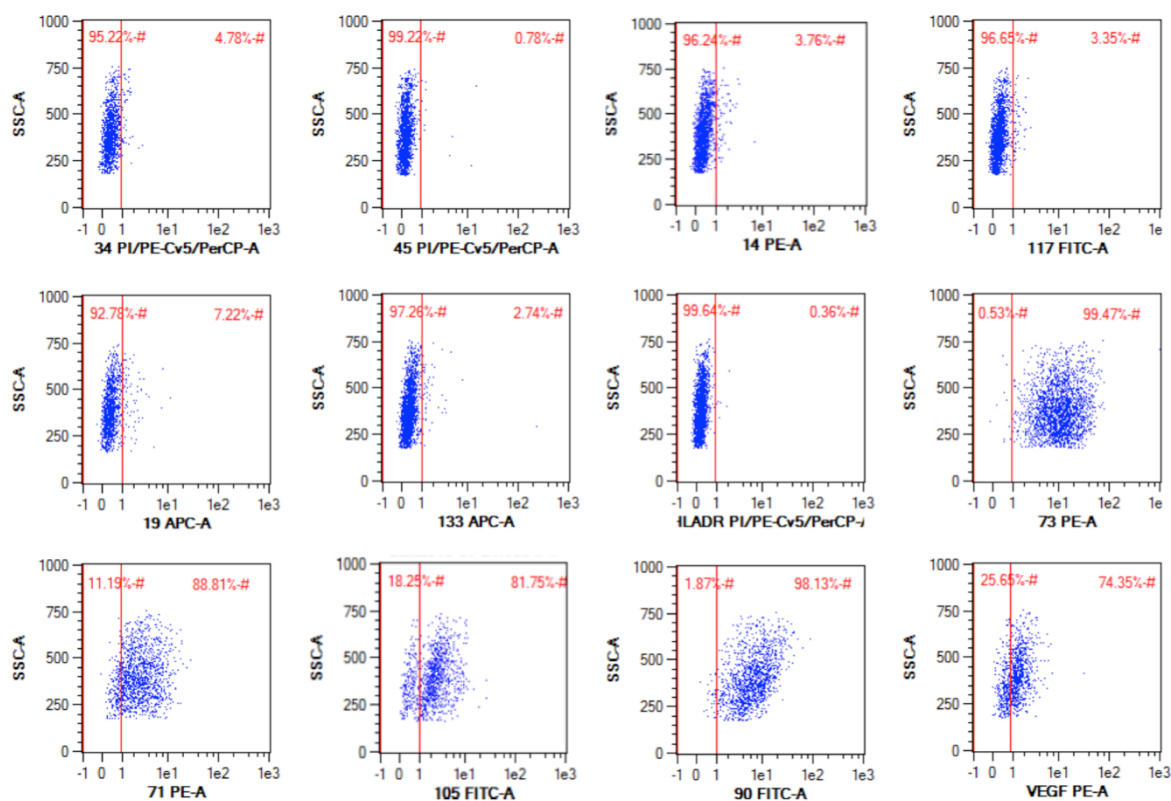


Gráfico 4. Ejemplo de citometría de las CTM de cresta ilíaca, paciente n°19. Se observa baja expresión de marcadores hematopoyéticos y leucocitarios (CD34, CD45, CD14, CD19, CD133), práctica ausencia de expresión de HLA-DR, y alta expresión de CD73, CD71, CD105, CD90 y VEGF.



## METÁFISIS DISTAL DE FÉMUR

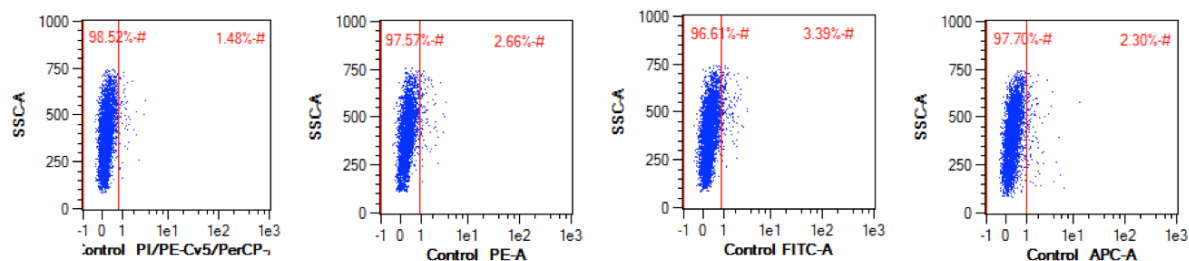


Gráfico 5. Ejemplo de citometría de control de autofluorescencia para CTM de metáfisis distal de fémur, paciente n°19.

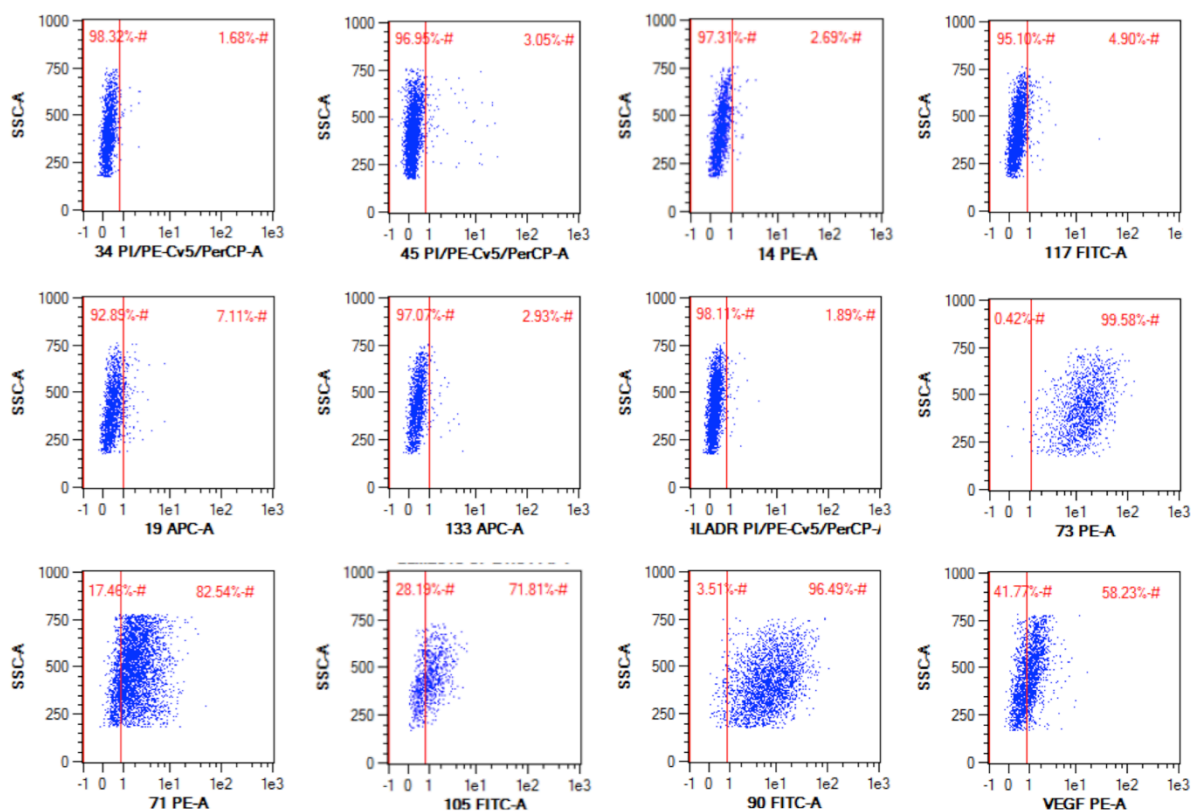


Gráfico 6. Ejemplo de citometría de las CTM de metáfisis distal de fémur, paciente n°19. Se observa en éstas células un patrón fenotípico prácticamente similar a las CTM procedentes de médula ósea de cresta iliaca.

## METÁFISIS PROXIMAL DE TIBIA

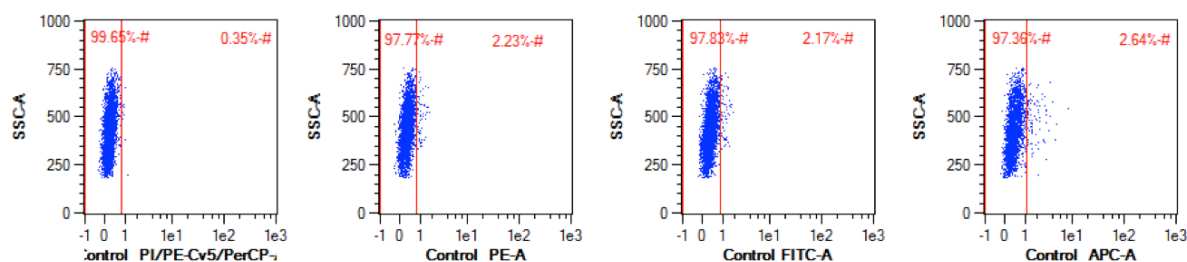


Gráfico 7. Ejemplo de citometría de control de autofluorescencia para CTM de metáfisis proximal de tibia, paciente nº19.

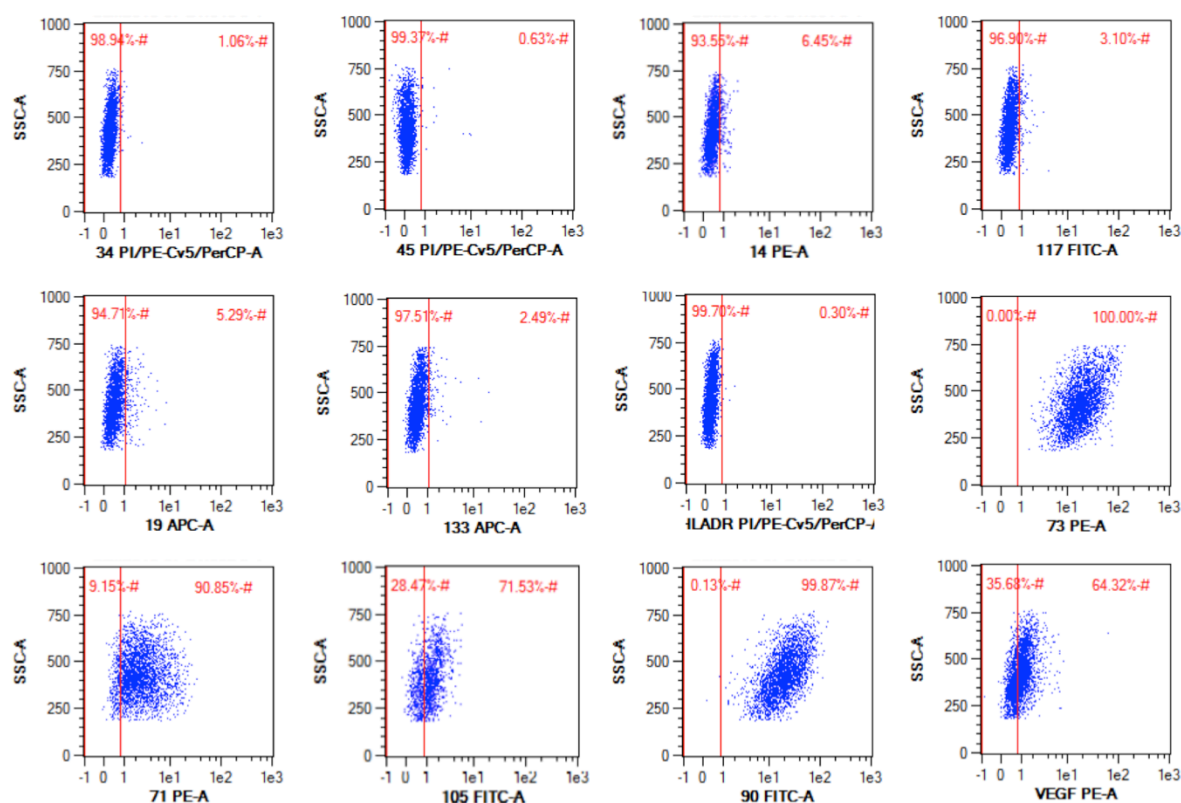


Gráfico 8. Ejemplo de citometría de las CTM de metáfisis proximal de tibia, paciente nº19. Para estos marcadores las células presentan un patrón fenotípico muy similar al encontrado en las CTM de cresta iliaca y metáfisis distal de fémur.

## 4.2 ESTADÍSTICA INFERENCIAL

### 4.2.1 Análisis comparativo de la celularidad entre cresta ilíaca y fémur:

#### Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

|   |                  | N     | Rango promedio | Suma de rangos |
|---|------------------|-------|----------------|----------------|
| Concentración Fémur -<br>Concentración Cresta           | Rangos negativos | 15(a) | 9,93           | 149,00         |
|   | Rangos positivos | 2(b)  | 2,00           | 4,00           |
|   | Empates          | 0(c)  |                |                |
|   | Total            | 17    |                |                |
| Viabilidad CMN (%) Fémur -<br>Viabilidad CMN (%) Cresta | Rangos negativos | 11(a) | 8,05           | 88,50          |
|   | Rangos positivos | 3(b)  | 5,50           | 16,50          |
|   | Empates          | 3(c)  |                |                |
|   | Total            | 17    |                |                |
| Plantadas Fémur - Plantadas<br>Cresta                   | Rangos negativos | 4(a)  | 2,50           | 10,00          |
|   | Rangos positivos | 0(b)  | ,00            | ,00            |
|   | Empates          | 13(c) |                |                |
|   | Total            | 17    |                |                |
| Nº final Fémur - Nº final Cresta                        | Rangos negativos | 7(a)  | 7,00           | 49,00          |
|   | Rangos positivos | 4(b)  | 4,25           | 17,00          |
|   | Empates          | 1(c)  |                |                |
|   | Total            | 12    |                |                |
| Viabilidad CTM (%) Fémur -<br>Viabilidad CTM (%) Cresta | Rangos negativos | 10(a) | 8,25           | 82,50          |
|   | Rangos positivos | 4(b)  | 5,63           | 22,50          |
|   | Empates          | 0(c)  |                |                |
|   | Total            | 14    |                |                |

a Valor en Fémur menor que valor en Cresta

b Valor en Fémur mayor que valor en Cresta

c Valor en Fémur igual que valor en Cresta

#### Estadísticos de contraste

|  | Z         | Sig. asintót. (bilateral) |
|--|-----------|---------------------------|
| Concentración Fémur - Concentración Cresta           | -3,432(a) | ,001*                     |
| Viabilidad CMN (%) Fémur - Viabilidad CMN (%) Cresta | -2,262(a) | ,024*                     |
| Plantadas Fémur - Plantadas Cresta                   | -1,841(a) | ,066                      |
| Nº final Fémur - Nº final Cresta                     | -1,423(a) | ,155                      |
| Días de cultivo Fémur - Días de cultivo Cresta       | -2,384(a) | ,017*                     |
| Viabilidad CTM (%) Fémur - Viabilidad CTM (%) Cresta | -1,885(a) | ,059                      |

a Basado en los rangos positivos.

\* Significación estadística (p<0,05)

Tabla 18. Análisis comparativo de la celularidad entre cresta ilíaca y fémur. Test de Wilcoxon.

Se observa una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) en cuanto a las variables de concentración de CMN y viabilidad de las CMN siendo superior en cresta ilíaca que en fémur. Por el contrario, no se observan diferencias estadísticamente significativas en cuanto al nº de células plantadas, nº de CTM obtenidas ni su viabilidad entre cresta ilíaca y fémur.

#### 4.2.2 Análisis comparativo de la celularidad entre cresta ilíaca y tibia:

##### Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

|   |                  | N     | Rango promedio | Suma de rangos |
|---|------------------|-------|----------------|----------------|
| Concentración Tibia -<br>Concentración Cresta           | Rangos negativos | 15(a) | 8,93           | 134,00         |
|   | Rangos positivos | 1(b)  | 2,00           | 2,00           |
|   | Empates          | 0(c)  |                |                |
|   | Total            | 16    |                |                |
| Viabilidad CMN (%) Tibia -<br>Viabilidad CMN (%) Cresta | Rangos negativos | 12(a) | 9,25           | 111,00         |
|   | Rangos positivos | 4(b)  | 6,25           | 25,00          |
|   | Empates          | 0(c)  |                |                |
|   | Total            | 16    |                |                |
| Plantadas Tibia - Plantadas Cresta                      | Rangos negativos | 2(a)  | 2,50           | 5,00           |
|   | Rangos positivos | 1(b)  | 1,00           | 1,00           |
|   | Empates          | 13(c) |                |                |
|   | Total            | 16    |                |                |
| Nº final Tibia - Nº final Cresta                        | Rangos negativos | 4(a)  | 5,50           | 22,00          |
|   | Rangos positivos | 3(b)  | 2,00           | 6,00           |
|   | Empates          | 1(c)  |                |                |
|   | Total            | 8     |                |                |
| Viabilidad CTM (%) Tibia -<br>Viabilidad CTM (%) Cresta | Rangos negativos | 5(a)  | 5,00           | 25,00          |
|   | Rangos positivos | 2(b)  | 1,50           | 3,00           |
|   | Empates          | 1(c)  |                |                |
|   | Total            | 8     |                |                |

a Valor en Tibia menor que valor en Cresta

b Valor en Tibia mayor que valor en Cresta

c Valor en Tibia igual que valor en Cresta

##### Estadísticos de contraste

|  | Z         | Sig. asintót. (bilateral) |
|--|-----------|---------------------------|
| Concentración Tibia - Concentración Cresta           | -3,413(a) | ,001*                     |
| Viabilidad CMN (%) Tibia - Viabilidad CMN (%) Cresta | -2,225(a) | ,026*                     |
| Plantadas Tibia - Plantadas Cresta                   | -1,069(a) | ,285                      |
| Nº final Tibia - Nº final Cresta                     | -1,352(a) | ,176                      |
| Viabilidad CTM (%) Tibia - Viabilidad CTM (%) Cresta | -1,863(a) | ,063                      |

a Basado en los rangos positivos.

\* Significación estadística ( $p < 0,05$ )

Tabla 19. Análisis comparativo de la celularidad entre cresta ilíaca y tibia. Test de Wilcoxon.

Se observa una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) en cuanto a las variables de concentración de CMN y viabilidad de las CMN siendo superior en cresta ilíaca que en tibia. Por el contrario, no se observan diferencias estadísticamente significativas en cuanto al nº de células plantadas, nº de CTM obtenidas ni su viabilidad entre cresta ilíaca y tibia.

### 4.2.3 Análisis comparativo de la celularidad entre fémur y tibia:

#### Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

|  |                  | N     | Rango promedio | Suma de rangos |
|--|------------------|-------|----------------|----------------|
| Concentración Tibia -<br>Concentración Fémur           | Rangos negativos | 7(a)  | 8,71           | 61,00          |
|  | Rangos positivos | 9(b)  | 8,33           | 75,00          |
|  | Empates          | 0(c)  |                |                |
|  | Total            | 16    |                |                |
| Viabilidad CMN (%) Tibia -<br>Viabilidad CMN (%) Fémur | Rangos negativos | 9(a)  | 7,94           | 71,50          |
|  | Rangos positivos | 7(b)  | 9,21           | 64,50          |
|  | Empates          | 0(c)  |                |                |
|  | Total            | 16    |                |                |
| Plantadas Tibia - Plantadas Fémur                      | Rangos negativos | 2(a)  | 1,50           | 3,00           |
|  | Rangos positivos | 1(b)  | 3,00           | 3,00           |
|  | Empates          | 13(v) |                |                |
|  | Total            | 16    |                |                |
| Nº final Tibia - Nº final Fémur                        | Rangos negativos | 7(a)  | 4,43           | 31,00          |
|  | Rangos positivos | 1(b)  | 5,00           | 5,00           |
|  | Empates          | 0(c)  |                |                |
|  | Total            | 8     |                |                |
| Viabilidad CTM (%) Tibia -<br>Viabilidad CTM (%) Fémur | Rangos negativos | 4(a)  | 3,63           | 14,50          |
|  | Rangos positivos | 3(b)  | 4,50           | 13,50          |
|  | Empates          | 1(c)  |                |                |
|  | Total            | 8     |                |                |

a Valor en Tibia menor que valor en Fémur

b Valor en Tibia mayor que valor en Fémur

c Valor en Tibia igual que valor en Fémur

#### Estadísticos de contraste

|   | Z         | Sig. asintót. (bilateral) |
|---|-----------|---------------------------|
| Concentración Tibia - Concentración Fémur           | -,362(a)  | ,717                      |
| Viabilidad CMN (%) Tibia - Viabilidad CMN (%) Fémur | -,181(b)  | ,856                      |
| Plantadas Tibia - Plantadas Fémur                   | ,000(c)   | 1,000                     |
| Nº final Tibia - Nº final Fémur                     | -1,820(b) | ,069                      |
| Viabilidad CTM (%) Tibia - Viabilidad CTM (%) Fémur | -,085(b)  | ,933                      |

a Basado en los rangos negativos.

b Basado en los rangos positivos.

c La suma de rangos negativos es igual a la suma de rangos positivos.

Tabla 20. Análisis comparativo de la celularidad entre tibia y fémur. Test de Wilcoxon.

No se observan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en ninguna de las variables estudiadas.

## 4.2.4 Análisis comparativo del fenotipo entre cresta y fémur:

## Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

|                                   |                  | N     | Rango promedio | Suma de rangos |
|-----------------------------------|------------------|-------|----------------|----------------|
| CD 34+ (ST) Fe - CD 34+ (ST) Cr   | Rangos negativos | 9(a)  | 7,22           | 65,00          |
|                                   | Rangos positivos | 3(b)  | 4,33           | 13,00          |
|                                   | Empates          | 0(c)  |                |                |
|                                   | Total            | 12    |                |                |
| CD 133+ (ST) Fe - CD 133+ (ST) Cr | Rangos negativos | 7(a)  | 6,29           | 44,00          |
|                                   | Rangos positivos | 3(b)  | 3,67           | 11,00          |
|                                   | Empates          | 0(c)  |                |                |
|                                   | Total            | 10    |                |                |
| CD 117+ (ST) Fe - CD 117+ (ST) Cr | Rangos negativos | 9(a)  | 6,78           | 61,00          |
|                                   | Rangos positivos | 3(b)  | 5,67           | 17,00          |
|                                   | Empates          | 0(c)  |                |                |
|                                   | Total            | 12    |                |                |
| CD 14+ (ST) Fe - CD 14+ (ST) Cr   | Rangos negativos | 2(a)  | 1,50           | 3,00           |
|                                   | Rangos positivos | 4(b)  | 4,50           | 18,00          |
|                                   | Empates          | 0(c)  |                |                |
|                                   | Total            | 6     |                |                |
| CD 34+ (CM) Fe - CD 34+ (CM) Cr   | Rangos negativos | 6(a)  | 5,75           | 34,50          |
|                                   | Rangos positivos | 3(b)  | 3,50           | 10,50          |
|                                   | Empates          | 0(c)  |                |                |
|                                   | Total            | 9     |                |                |
| CD 133+ (CM) Fe - CD 133+ (CM) Cr | Rangos negativos | 9(a)  | 5,00           | 45,00          |
|                                   | Rangos positivos | 0(b)  | ,00            | ,00            |
|                                   | Empates          | 1(c)  |                |                |
|                                   | Total            | 10    |                |                |
| CD 117+ (CM) Fe - CD 117+ (CM) Cr | Rangos negativos | 7(a)  | 5,07           | 35,50          |
|                                   | Rangos positivos | 2(b)  | 4,75           | 9,50           |
|                                   | Empates          | 0(c)  |                |                |
|                                   | Total            | 9     |                |                |
| CD 3+ (CM) Fe - CD 3+ (CM) Cr     | Rangos negativos | 3(a)  | 4,67           | 14,00          |
|                                   | Rangos positivos | 7(b)  | 5,86           | 41,00          |
|                                   | Empates          | 0(c)  |                |                |
|                                   | Total            | 10    |                |                |
| CD 14+ (CM) Fe - CD 14+ (CM) Cr   | Rangos negativos | 6(a)  | 5,67           | 34,00          |
|                                   | Rangos positivos | 4(b)  | 5,25           | 21,00          |
|                                   | Empates          | 0(c)  |                |                |
|                                   | Total            | 10    |                |                |
| CD 90+ (CM) Fe - CD 90+ (CM) Cr   | Rangos negativos | 5(a)  | 4,40           | 22,00          |
|                                   | Rangos positivos | 3(b)  | 4,67           | 14,00          |
|                                   | Empates          | 1(c)  |                |                |
|                                   | Total            | 9     |                |                |
| CD106+ (CM) Fe - CD106+ (CM) Cr   | Rangos negativos | 3(a)  | 3,33           | 10,00          |
|                                   | Rangos positivos | 2(b)  | 2,50           | 5,00           |
|                                   | Empates          | 1(c)  |                |                |
|                                   | Total            | 6     |                |                |
| CD 105+ (CM) Fe - CD 105+ (CM) Cr | Rangos negativos | 10(a) | 5,50           | 55,00          |
|                                   | Rangos positivos | 0(b)  | ,00            | ,00            |
|                                   | Empates          | 0(c)  |                |                |
|                                   | Total            | 10    |                |                |
| VEGF + (CM) Fe - VEGF + (CM) Cr   | Rangos negativos | 4(a)  | 6,38           | 25,50          |
|                                   | Rangos positivos | 4(b)  | 2,63           | 10,50          |
|                                   | Empates          | 0(c)  |                |                |
|                                   | Total            | 8     |                |                |
| CD 31+ (CM) Fe - CD 31+ (CM) Cr   | Rangos negativos | 5(a)  | 5,20           | 26,00          |
|                                   | Rangos positivos | 4(b)  | 4,75           | 19,00          |
|                                   | Empates          | 0(c)  |                |                |
|                                   | Total            | 9     |                |                |
| CD 73+ (CM) Fe - CD 73+ (CM) Cr   | Rangos negativos | 2(a)  | 2,50           | 5,00           |
|                                   | Rangos positivos | 7(b)  | 5,71           | 40,00          |
|                                   | Empates          | 0(c)  |                |                |
|                                   | Total            | 9     |                |                |
| CD 71+ (CM) Fe - CD 71+ (CM) Cr   | Rangos negativos | 7(a)  | 4,86           | 34,00          |
|                                   | Rangos positivos | 1(b)  | 2,00           | 2,00           |
|                                   | Empates          | 0(c)  |                |                |
|                                   | Total            | 8     |                |                |
| CD 184+ (CM) Fe - CD 184+ (CM) Cr | Rangos negativos | 4(a)  | 4,00           | 16,00          |
|                                   | Rangos positivos | 4(b)  | 5,00           | 20,00          |
|                                   | Empates          | 0(c)  |                |                |
|                                   | Total            | 8     |                |                |
| CD 271+ (CM) Fe - CD 271+ (CM) Cr | Rangos negativos | 4(a)  | 4,25           | 17,00          |
|                                   | Rangos positivos | 3(b)  | 3,67           | 11,00          |
|                                   | Empates          | 1(c)  |                |                |
|                                   | Total            | 8     |                |                |

a Valor en Fémur menor que valor en Cresta

b Valor en Fémur mayor que valor en Cresta

c Valor en Fémur igual que valor en Cresta



### Estadísticos de contraste

|                                   | Z         | Sig. asintót. (bilateral) |
|-----------------------------------|-----------|---------------------------|
| CD 34+ (ST) Fe - CD 34+ (ST) Cr   | -2,040(a) | ,041*                     |
| CD 133+ (ST) Fe - CD 133+ (ST) Cr | -1,686(a) | ,092                      |
| CD 117+ (ST) Fe - CD 117+ (ST) Cr | -1,726(a) | ,084                      |
| CD 14+ (ST) Fe - CD 14+ (ST) Cr   | -1,577(b) | ,115                      |
| CD 34+ (CM) Fe - CD 34+ (CM) Cr   | -1,423(a) | ,155                      |
| CD 133+ (CM) Fe - CD 133+ (CM) Cr | -2,666(a) | ,008*                     |
| CD 117+ (CM) Fe - CD 117+ (CM) Cr | -1,541(a) | ,123                      |
| CD 3+ (CM) Fe - CD 3+ (CM) Cr     | -1,376(b) | ,169                      |
| CD 14+ (CM) Fe - CD 14+ (CM) Cr   | -,663(a)  | ,508                      |
| CD 90+ (CM) Fe - CD 90+ (CM) Cr   | -,560(a)  | ,575                      |
| CD106+ (CM) Fe - CD106+ (CM) Cr   | -,674(a)  | ,500                      |
| CD 105+ (CM) Fe - CD 105+ (CM) Cr | -2,803(a) | ,005*                     |
| VEGF + (CM) Fe - VEGF + (CM) Cr   | -1,051(a) | ,293                      |
| CD 31+ (CM) Fe - CD 31+ (CM) Cr   | -,415(a)  | ,678                      |
| CD 73+ (CM) Fe - CD 73+ (CM) Cr   | -2,073(b) | ,038*                     |
| CD 71+ (CM) Fe - CD 71+ (CM) Cr   | -2,240(a) | ,025*                     |
| CD 184+ (CM) Fe - CD 184+ (CM) Cr | -,280(b)  | ,779                      |
| CD 271+ (CM) Fe - CD 271+ (CM) Cr | -,507(a)  | ,612                      |

a Basado en los rangos positivos.

b Basado en los rangos negativos.

\* Significación estadística ( $p < 0,05$ )

Tabla 21. Análisis comparativo del fenotipo entre cresta ilíaca y fémur. Test de Wilcoxon.

Se observan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) para los marcadores: CD34 (ST), CD133 (CM), CD105 (CM) y CD71 (CM) presentando en estos casos, y de manera significativa, un mayor porcentaje de células positivas para este marcador en cresta ilíaca.

También se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) para la expresión del marcador CD73 (CM), presentando en estos casos un mayor porcentaje de células positivas para este marcador en fémur.

## 4.2.5 Análisis comparativo del fenotipo entre cresta y tibia:

## Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

|                                   |                  | N    | Rango promedio | Suma de rangos |
|-----------------------------------|------------------|------|----------------|----------------|
| CD 34+ (ST) Ti - CD 34+ (ST) Cr   | Rangos negativos | 7(a) | 4,86           | 34,00          |
|                                   | Rangos positivos | 1(b) | 2,00           | 2,00           |
|                                   | Empates          | 0(c) |                |                |
|                                   | Total            | 8    |                |                |
| CD 133+ (ST) Ti - CD 133+ (ST) Cr | Rangos negativos | 7(a) | 4,86           | 34,00          |
|                                   | Rangos positivos | 1(b) | 2,00           | 2,00           |
|                                   | Empates          | 0(c) |                |                |
|                                   | Total            | 8    |                |                |
| CD 117+ (ST) Ti - CD 117+ (ST) Cr | Rangos negativos | 8(a) | 4,50           | 36,00          |
|                                   | Rangos positivos | 0(b) | ,00            | ,00            |
|                                   | Empates          | 0(c) |                |                |
|                                   | Total            | 8    |                |                |
| CD 14+ (ST) Ti - CD 14+ (ST) Cr   | Rangos negativos | 1(a) | 2,00           | 2,00           |
|                                   | Rangos positivos | 3(b) | 2,67           | 8,00           |
|                                   | Empates          | 0(c) |                |                |
|                                   | Total            | 4    |                |                |
| CD 34+ (CM) Ti - CD 34+ (CM) Cr   | Rangos negativos | 8(a) | 4,50           | 36,00          |
|                                   | Rangos positivos | 0(b) | ,00            | ,00            |
|                                   | Empates          | 0(c) |                |                |
|                                   | Total            | 8    |                |                |
| CD 133+ (CM) Ti - CD 133+ (CM) Cr | Rangos negativos | 6(a) | 5,67           | 34,00          |
|                                   | Rangos positivos | 3(b) | 3,67           | 11,00          |
|                                   | Empates          | 0(c) |                |                |
|                                   | Total            | 9    |                |                |
| CD 117+ (CM) Ti - CD 117+ (CM) Cr | Rangos negativos | 6(a) | 4,17           | 25,00          |
|                                   | Rangos positivos | 2(b) | 5,50           | 11,00          |
|                                   | Empates          | 0(c) |                |                |
|                                   | Total            | 8    |                |                |
| CD 3+ (CM) Ti - CD 3+ (CM) Cr     | Rangos negativos | 2(a) | 3,00           | 6,00           |
|                                   | Rangos positivos | 7(b) | 5,57           | 39,00          |
|                                   | Empates          | 0(c) |                |                |
|                                   | Total            | 9    |                |                |
| CD 14+ (CM) Ti - CD 14+ (CM) Cr   | Rangos negativos | 3(a) | 5,67           | 17,00          |
|                                   | Rangos positivos | 6(b) | 4,67           | 28,00          |
|                                   | Empates          | 0(c) |                |                |
|                                   | Total            | 9    |                |                |
| CD 90+ (CM) Ti - CD 90+ (CM) Cr   | Rangos negativos | 4(a) | 4,50           | 18,00          |
|                                   | Rangos positivos | 5(b) | 5,40           | 27,00          |
|                                   | Empates          | 0(c) |                |                |
|                                   | Total            | 9    |                |                |
| CD106+ (CM) Ti - CD106+ (CM) Cr   | Rangos negativos | 4(a) | 3,00           | 12,00          |
|                                   | Rangos positivos | 2(b) | 4,50           | 9,00           |
|                                   | Empates          | 0(c) |                |                |
|                                   | Total            | 6    |                |                |
| CD 105+ (CM) Ti - CD 105+ (CM) Cr | Rangos negativos | 8(a) | 4,63           | 37,00          |
|                                   | Rangos positivos | 1(b) | 8,00           | 8,00           |
|                                   | Empates          | 0(c) |                |                |
|                                   | Total            | 9    |                |                |
| VEGF + (CM) Ti - VEGF + (CM) Cr   | Rangos negativos | 3(a) | 5,67           | 17,00          |
|                                   | Rangos positivos | 5(b) | 3,80           | 19,00          |
|                                   | Empates          | 0(c) |                |                |
|                                   | Total            | 8    |                |                |
| CD 31+ (CM) Ti - CD 31+ (CM) Cr   | Rangos negativos | 4(a) | 4,75           | 19,00          |
|                                   | Rangos positivos | 4(b) | 4,25           | 17,00          |
|                                   | Empates          | 0(c) |                |                |
|                                   | Total            | 8    |                |                |
| CD 73+ (CM) Ti - CD 73+ (CM) Cr   | Rangos negativos | 3(a) | 5,33           | 16,00          |
|                                   | Rangos positivos | 6(b) | 4,83           | 29,00          |
|                                   | Empates          | 0(c) |                |                |
|                                   | Total            | 9    |                |                |
| CD 71+ (CM) Ti - CD 71+ (CM) Cr   | Rangos negativos | 6(a) | 4,50           | 27,00          |
|                                   | Rangos positivos | 2(b) | 4,50           | 9,00           |
|                                   | Empates          | 0(c) |                |                |
|                                   | Total            | 8    |                |                |
| CD 184+ (CM) Ti - CD 184+ (CM) Cr | Rangos negativos | 7(a) | 4,71           | 33,00          |
|                                   | Rangos positivos | 1(b) | 3,00           | 3,00           |
|                                   | Empates          | 0(c) |                |                |
|                                   | Total            | 8    |                |                |
| CD 271+ (CM) Ti - CD 271+ (CM) Cr | Rangos negativos | 4(a) | 3,50           | 14,00          |
|                                   | Rangos positivos | 2(b) | 3,50           | 7,00           |
|                                   | Empates          | 1(a) |                |                |
|                                   | Total            | 7    |                |                |

a Valor en Fémur menor que valor en Cresta

b Valor en Fémur mayor que valor en Cresta

c Valor en Fémur igual que valor en Cresta

### Estadísticos de contraste

|                                   | Z         | Sig. asintót. (bilateral) |
|-----------------------------------|-----------|---------------------------|
| CD 34+ (ST) Ti - CD 34+ (ST) Cr   | -2,240(a) | ,025*                     |
| CD 133+ (ST) Ti - CD 133+ (ST) Cr | -2,243(a) | ,025*                     |
| CD 117+ (ST) Ti - CD 117+ (ST) Cr | -2,521(a) | ,012*                     |
| CD 14+ (ST) Ti - CD 14+ (ST) Cr   | -1,095(b) | ,273                      |
| CD 34+ (CM) Ti - CD 34+ (CM) Cr   | -2,524(a) | ,012*                     |
| CD 133+ (CM) Ti - CD 133+ (CM) Cr | -1,364(a) | ,173                      |
| CD 117+ (CM) Ti - CD 117+ (CM) Cr | -,980(a)  | ,327                      |
| CD 3+ (CM) Ti - CD 3+ (CM) Cr     | -1,955(b) | ,051                      |
| CD 14+ (CM) Ti - CD 14+ (CM) Cr   | -,652(b)  | ,515                      |
| CD 90+ (CM) Ti - CD 90+ (CM) Cr   | -,533(b)  | ,594                      |
| CD106+ (CM) Ti - CD106+ (CM) Cr   | -,315(a)  | ,752                      |
| CD 105+ (CM) Ti - CD 105+ (CM) Cr | -1,718(a) | ,086                      |
| VEGF + (CM) Ti - VEGF + (CM) Cr   | -,140(b)  | ,889                      |
| CD 31+ (CM) Ti - CD 31+ (CM) Cr   | -,140(a)  | ,889                      |
| CD 73+ (CM) Ti - CD 73+ (CM) Cr   | -,770(b)  | ,441                      |
| CD 71+ (CM) Ti - CD 71+ (CM) Cr   | -1,260(a) | ,208                      |
| CD 184+ (CM) Ti - CD 184+ (CM) Cr | -2,106(a) | ,035*                     |
| CD 271+ (CM) Ti - CD 271+ (CM) Cr | -,734(a)  | ,463                      |

a Basado en los rangos positivos.

b Basado en los rangos negativos.

\* Significación estadística ( $p < 0,05$ )

Tabla 22. Análisis comparativo del fenotipo entre cresta ilíaca y tibia. Test de Wilcoxon.

Se observan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) para los marcadores: CD34 (ST), CD133 (ST), CD117 (ST), CD34 (CM) y CD184 (CM), presentando en estos casos un mayor porcentaje de células positivas para este marcador en cresta ilíaca.

### 4.2.6 Correlaciones no paramétricas (Rho de Spearman)

#### Correlaciones Cresta Iliaca

|                    |                           |                                | Concentración<br>Cresta | Viabilidad<br>CMN (%)<br>Cresta | Éxito del<br>cultivo<br>Cresta | Edad  |
|--------------------|---------------------------|--------------------------------|-------------------------|---------------------------------|--------------------------------|-------|
| Rho de<br>Spearman | Concentración Cresta      | Coefficiente de<br>correlación | 1,000                   | ,198                            | -,347                          | ,317  |
|                    |                           | Sig. (bilateral)               | .                       | ,402                            | ,134                           | ,173  |
|                    |                           | N                              | 20                      | 20                              | 20                             | 20    |
|                    | Viabilidad CMN (%) Cresta | Coefficiente de<br>correlación | ,198                    | 1,000                           | -,161                          | ,175  |
|                    |                           | Sig. (bilateral)               | ,402                    | .                               | ,497                           | ,459  |
|                    |                           | N                              | 20                      | 20                              | 20                             | 20    |
|                    | Éxito del cultivo Cresta  | Coefficiente de<br>correlación | -,347                   | -,161                           | 1,000                          | ,191  |
|                    |                           | Sig. (bilateral)               | ,134                    | ,497                            | .                              | ,420  |
|                    |                           | N                              | 20                      | 20                              | 20                             | 20    |
|                    | Edad                      | Coefficiente de<br>correlación | ,317                    | ,175                            | ,191                           | 1,000 |
|                    |                           | Sig. (bilateral)               | ,173                    | ,459                            | ,420                           | .     |
|                    |                           | N                              | 20                      | 20                              | 20                             | 20    |

Tabla 23. Correlación entre concentración de las CMN, viabilidad CMN, éxito de los cultivos y edad para cresta iliaca. (Rho de Spearman).

#### Correlaciones Fémur

|                    |                          |                                | Concentración<br>Fémur | Viabilidad<br>CMN (%)<br>Fémur | Éxito del<br>cultivo<br>Fémur | Edad  |
|--------------------|--------------------------|--------------------------------|------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------|
| Rho de<br>Spearman | Concentración Fémur      | Coefficiente de<br>correlación | 1,000                  | -,173                          | ,190                          | -,253 |
|                    |                          | Sig. (bilateral)               | .                      | ,507                           | ,481                          | ,328  |
|                    |                          | N                              | 17                     | 17                             | 16                            | 17    |
|                    | Viabilidad CMN (%) Fémur | Coefficiente de<br>correlación | -,173                  | 1,000                          | ,106                          | ,093  |
|                    |                          | Sig. (bilateral)               | ,507                   | .                              | ,685                          | ,722  |
|                    |                          | N                              | 17                     | 17                             | 17                            | 17    |
|                    | Éxito del cultivo Fémur  | Coefficiente de<br>correlación | ,190                   | ,106                           | 1,000                         | ,147  |
|                    |                          | Sig. (bilateral)               | ,481                   | ,685                           | .                             | ,573  |
|                    |                          | N                              | 16                     | 17                             | 17                            | 17    |
|                    | Edad                     | Coefficiente de<br>correlación | -,253                  | ,093                           | ,147                          | 1,000 |
|                    |                          | Sig. (bilateral)               | ,328                   | ,722                           | ,573                          | .     |
|                    |                          | N                              | 17                     | 17                             | 17                            | 20    |

Tabla 24. Correlación entre concentración de las CMN, viabilidad CMN, éxito de los cultivos y edad para fémur. (Rho de Spearman).

### Correlaciones Tibia

|                    |                          |                                | Concentración<br>Tibia | Viabilidad<br>CMN (%)<br>Tibia | Éxito del<br>cultivo<br>Tibia | Edad  |
|--------------------|--------------------------|--------------------------------|------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------|
| Rho de<br>Spearman | Concentración Tibia      | Coefficiente de<br>correlación | 1,000                  | -,193                          | ,190                          | ,223  |
|                    |                          | Sig. (bilateral)               | .                      | ,474                           | ,481                          | ,407  |
|                    |                          | N                              | 16                     | 16                             | 16                            | 16    |
|                    | Viabilidad CMN (%) Tibia | Coefficiente de<br>correlación | -,193                  | 1,000                          | ,095                          | ,065  |
|                    |                          | Sig. (bilateral)               | ,474                   | .                              | ,726                          | ,810  |
|                    |                          | N                              | 16                     | 16                             | 16                            | 16    |
|                    | Éxito del cultivo Tibia  | Coefficiente de<br>correlación | ,190                   | ,095                           | 1,000                         | -,097 |
|                    |                          | Sig. (bilateral)               | ,481                   | ,726                           | .                             | ,722  |
|                    |                          | N                              | 16                     | 16                             | 16                            | 16    |
|                    | Edad                     | Coefficiente de<br>correlación | ,223                   | ,065                           | -,097                         | 1,000 |
|                    |                          | Sig. (bilateral)               | ,407                   | ,810                           | ,722                          | .     |
|                    |                          | N                              | 16                     | 16                             | 16                            | 20    |

Tabla 25. Correlación entre concentración de las CMN, viabilidad CMN, éxito de los cultivos y edad para tibia.  
(Rho de Spearman).

No se observó ningún grado significativo de correlación entre las variables *Concentración de CMN*, *Viabilidad de CMN*, *éxito de los cultivos* ni la *Edad* (para este grupo etario, 64-75 años) en los tres grupos.

### 4.3 DIFERENCIACIÓN HACIA HUESO, GRASA Y CARTÍLAGO

La diferenciación hacia grasa, hueso y cartílago se consiguió satisfactoriamente en todas las muestras procedentes de cresta ilíaca, metáfisis distal de fémur y metáfisis proximal de tibia sometidas a diferenciación.

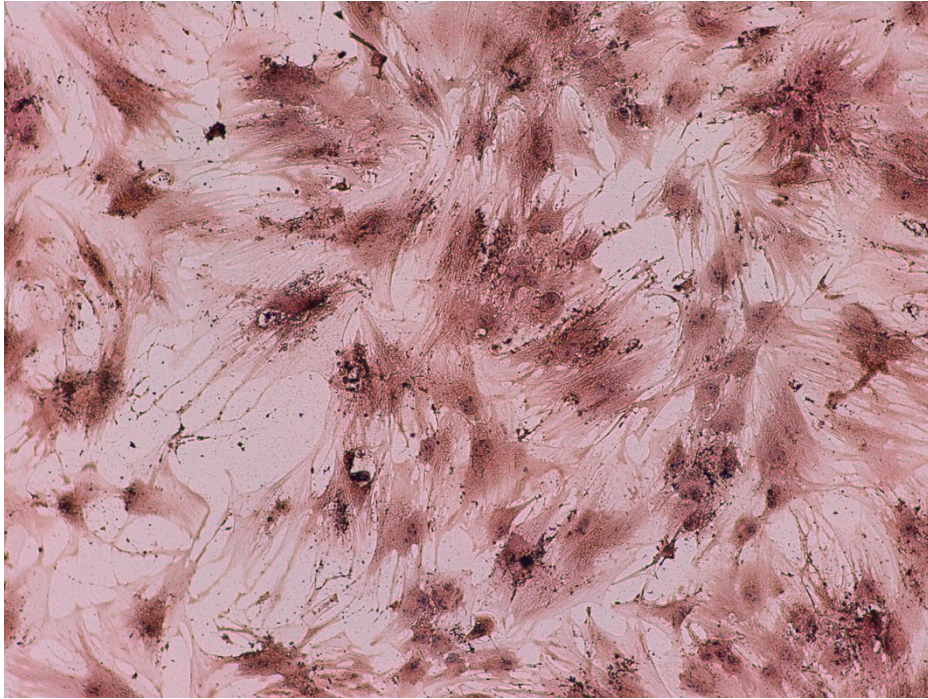
La diferenciación hacia osteoblastos se demostró por la visualización al microscopio de depósitos granulares de calcio extracelular en las muestras teñidas con rojo de alizarina.

La diferenciación hacia grasa quedó demostrada por la visualización en todas las muestras sometidas a adipogénesis, de células con grandes vacuolas de contenido lipídico en teñidas con Aceite Rojo O.

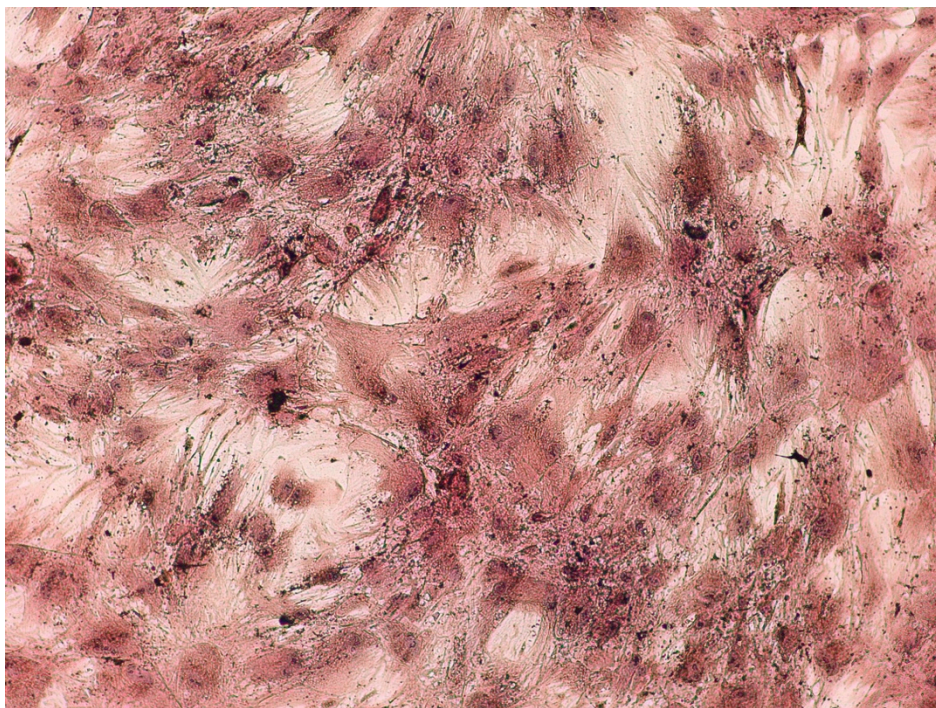
La diferenciación hacia cartílago también se consiguió en todas las muestras. Se demostró tras visualizar al microscopio depósitos extracelulares de proteoglicanos teñidos de azul en las muestras sometidas a condrogénesis y tras tinción con azul de Toluidina.

A continuación a modo de ejemplo se presentan unas imágenes de microscopía de cultivos de CTM sometidas a diferenciación (figuras 22-30).





*Fig 22. Diferenciación osteogénica (X10 aumentos), CTM procedentes de cresta, paciente n°18. Tinción con rojo de Alizarina. Se observan depósitos granulares de calcio teñidos de rojo.*



*Fig 23. Diferenciación osteogénica (X10 aumentos), CTM procedentes de fémur, paciente n°10.*



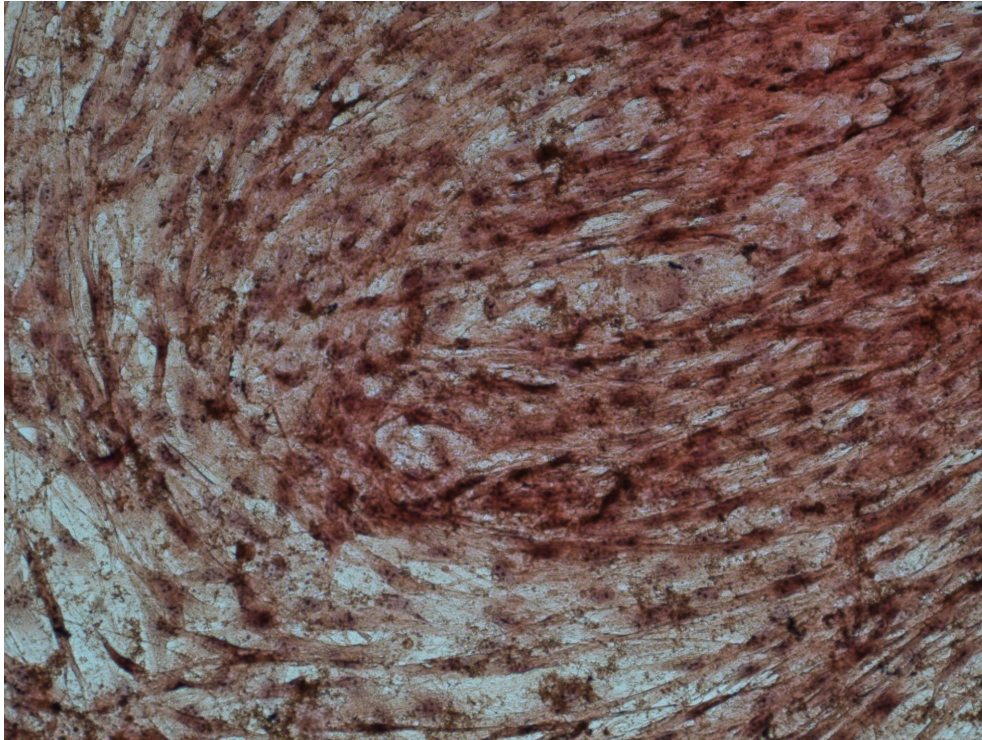


Fig 24. Diferenciación osteogénica (X20 aumentos), CTM procedentes de tibia, paciente n°10.

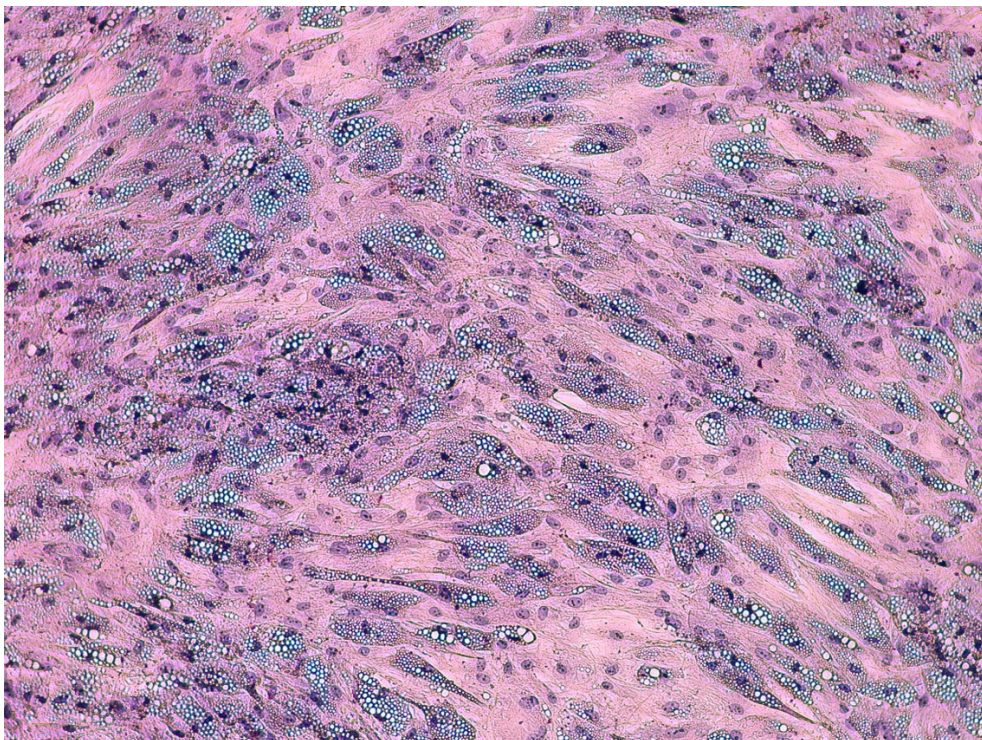
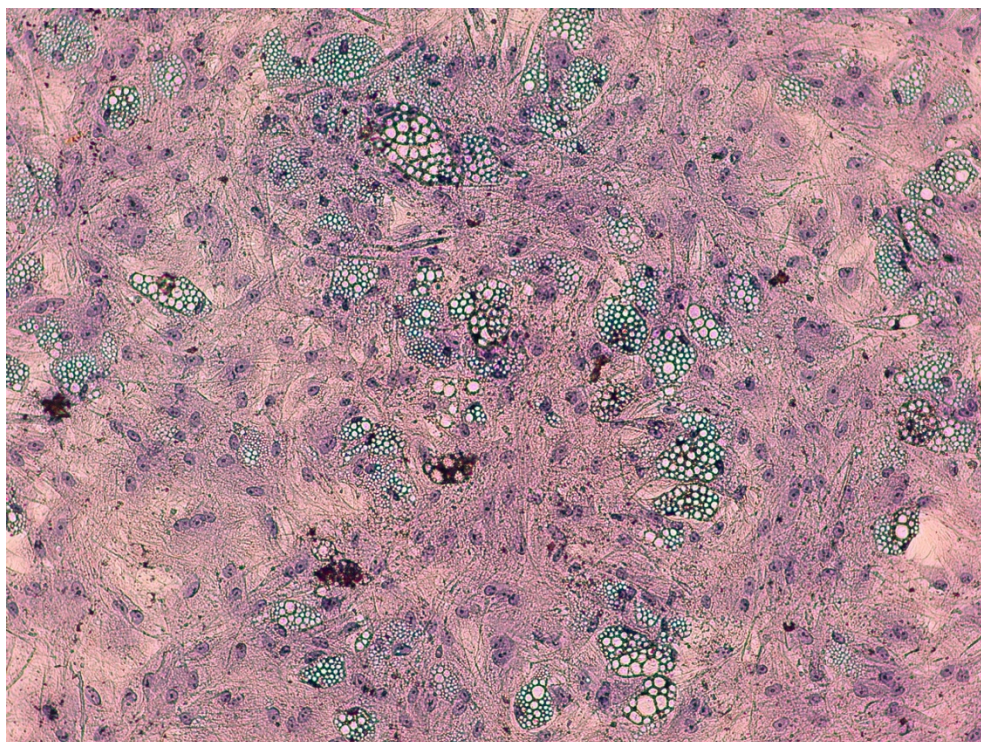


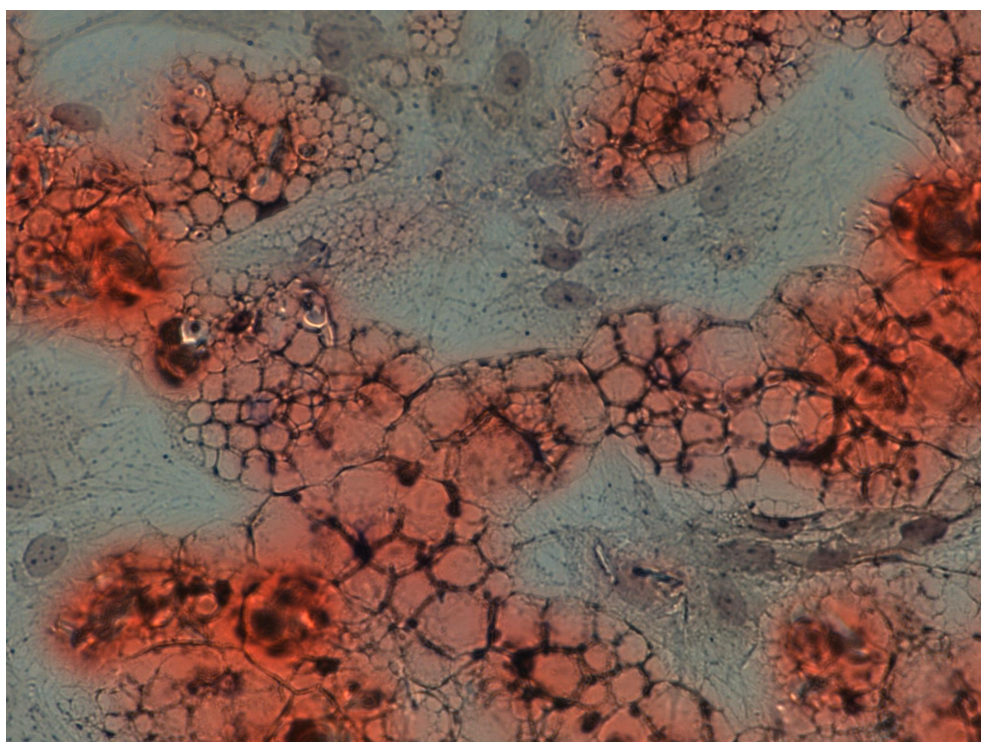
Fig 25. Diferenciación adipogénica (X10 aumentos), CTM procedentes de cresta, paciente n°18.

Tinción con Aceite rojo O. Se observan células con vacuolas lipídicas.



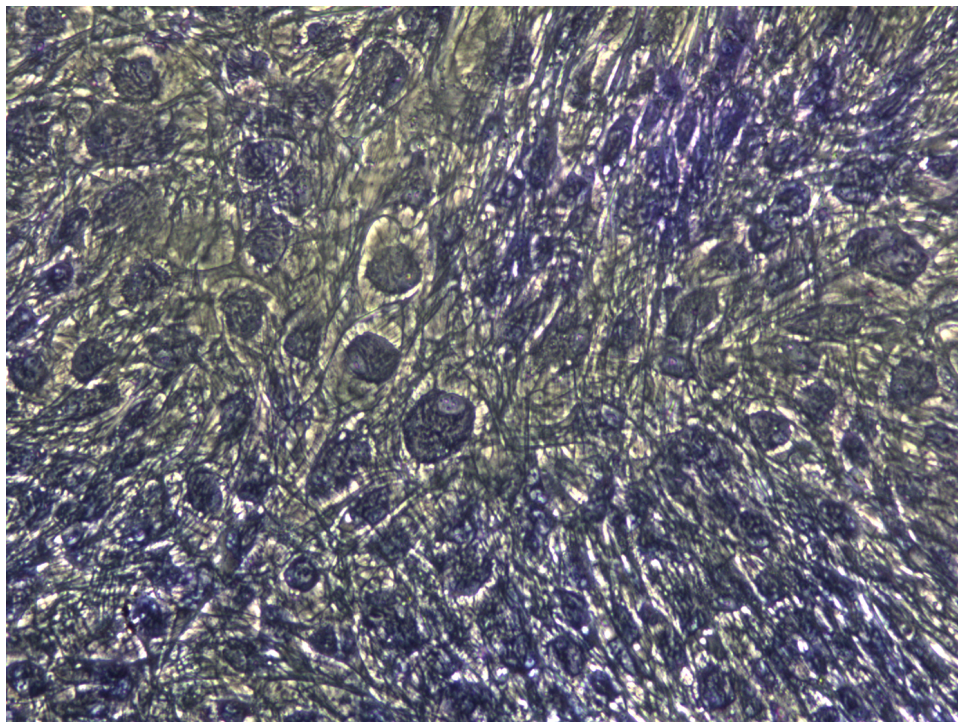


*Fig 26. Diferenciación adipogénica (X10 aumentos), CTM procedentes de fémur, paciente n°10.*

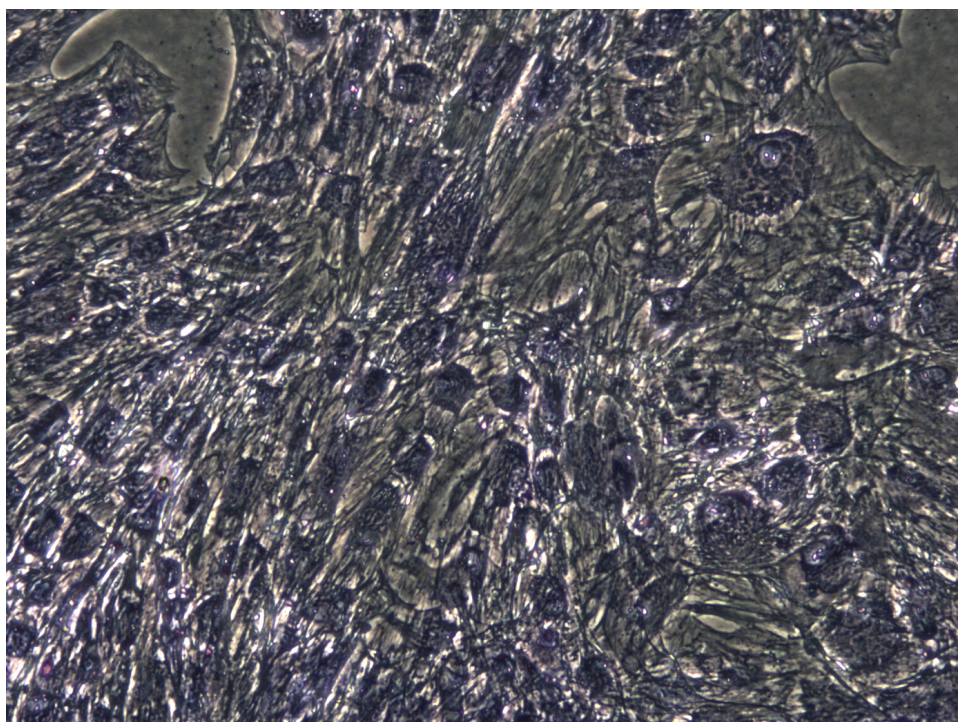


*Fig 27. Diferenciación adipogénica (X40 aumentos), CTM procedentes de tibia, paciente n°10.*



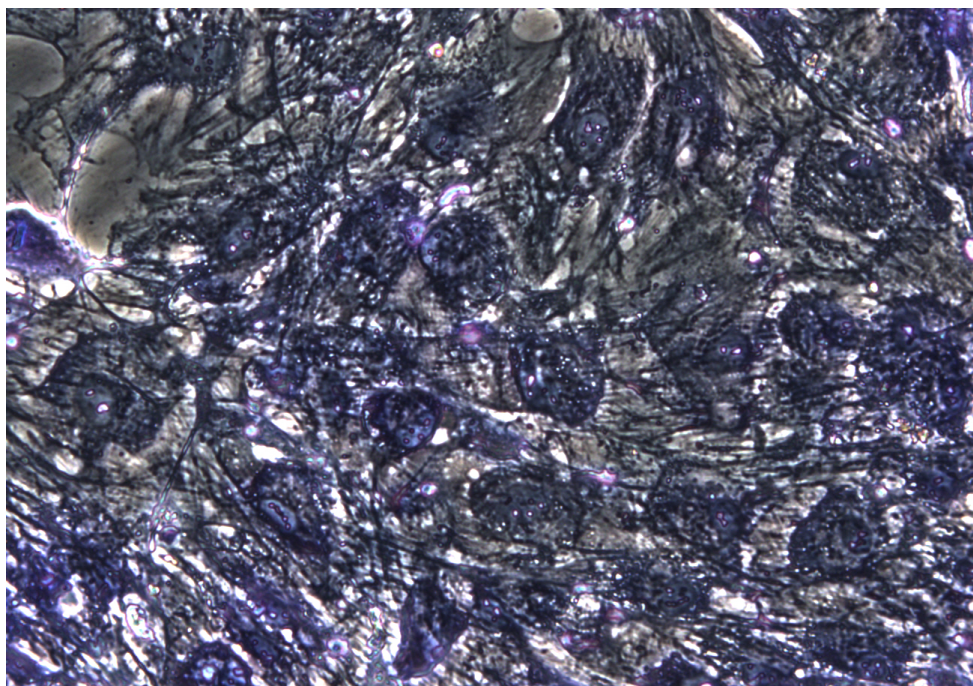


*Fig 28. Diferenciación condrogénica (X10 aumentos), CTM procedentes de cresta, paciente n°18. Tinción con Azul de Toluidina. Se aprecia abundante matriz extracelular teñida de azul (Proteoglicanos).*



*Fig 29. Diferenciación condrogénica (X10 aumentos), CTM procedentes de fémur, paciente n°10.*





*Fig 30. Diferenciación condrogénica (X20 aumentos), CTM procedentes de tibia, paciente n°10.*

## 5. DISCUSIÓN

## 5.1 Motivo del estudio

El descubrimiento de las capacidades terapéuticas de las células troncales mesenquimales ha generado un aumento de la actividad investigadora en este campo, y ya se empiezan a utilizar en ensayos clínicos (Horwitz EM et al. 2002; Duijvestein M et al. 2010; Sanz-Ruiz R et al. 2010).

El descubrimiento de la plasticidad de las CTM del organismo adulto ha creado una gran expectativa, por lo que muchos de los estudios actuales investigan nuevas fuentes o métodos para optimizar la obtención de éstas células.

Las dos fuentes fundamentales de CTM en el adulto son el panículo adiposo y la médula ósea. No obstante los métodos para la obtención de la grasa requieren instrumental específico y una técnica con la que muchos investigadores no se sienten capacitados, pese a que es una fuente fiable y muy rica en células troncales mesenquimales.

La médula ósea ha sido tradicionalmente la fuente más empleada para la obtención de CTM. En concreto, la médula de la cresta ilíaca ha sido ampliamente estudiada y los métodos para su obtención están bien descritos. Inicialmente, la obtención de médula ósea para el diagnóstico de diversas enfermedades era realizada en el esternón, dada su localización subcutánea. En la década de los 40, Rubinstein describió por primera vez la técnica para punción-aspiración de M.O del ilíaco por vía posterior. En el artículo publicado indica las ventajas de esta nueva técnica; área anatómica relativamente libre

de órganos o estructuras nobles, gran volumen de hueso esponjoso, menor aprensión del paciente (frente a la punción esternal, por su cercanía al corazón), bilateralidad y la obtención de una muestra de mejor calidad para el diagnóstico de enfermedades neoplásicas (Rubinstein MA 1948). Por este motivo, desde entonces, y hasta nuestros días, la cresta ilíaca ha sido la localización de elección para el estudio de células troncales de médula ósea.

Pese a que la técnica para extracción de médula ósea mediante punción y aspiración precisa de una curva de aprendizaje, este método es rápidamente accesible con menor necesidad de medios técnicos y alta rentabilidad.

La necesidad de encontrar nuevas fuentes de CTM de médula ósea ha hecho que los investigadores se planteen otras localizaciones alternativas a la cresta ilíaca, buscando un acceso más fácil, seguro y cercano al campo quirúrgico. Los cirujanos ortopédicos durante sus procedimientos han podido observar que existen otros huesos con estructura esponjosa similar a la presente en cresta ilíaca, como por ejemplo la cabeza humeral y el cuerpo vertebral. Pese a ello son muy pocos los estudios realizados sobre la presencia de células troncales mesenquimales en estos niveles.

Tal es el caso de estudios como el realizado por McLain y colaboradores en cuerpo vertebral (McLain RF et al. 2005). En dicho estudio se realiza el aspirado de médula ósea, por punción de cuerpo vertebral durante cirugía de artrodesis instrumentada posterior, y analizan la celularidad de la muestra. Encuentran que la concentración de células mononucleadas es similar, y en

ocasiones superior a la hallada en cresta ilíaca. También describen la existencia de células troncales mesenquimales en una proporción, características y fenotipo similares a las CTM presentes en médula ósea de cresta ilíaca.

Otros estudios recientes, y de gran relevancia, son los realizados en cabeza humeral por Mazzocca y colaboradores en 2010 y 2011. En sus estudios realizan aspirados de médula ósea en metáfisis de cabeza humeral durante la cirugía de reparación artroscópica de manguito rotador. Demuestran la presencia de células troncales mesenquimales, con una concentración de CMN parecida a cresta ilíaca, y consiguen diferenciación de éstas células a hueso y tendón. (Mazzocca AD et al. 2010; Mazzocca AD et al. 2011).

En este trabajo de investigación se estudia la presencia de células troncales mesenquimales, a nivel de la médula ósea, de las metáfisis distal de fémur y proximal de tibia.

La elección de estas localizaciones se basa en tres motivos; el primero es que el aspecto macroscópico del hueso esponjoso a este nivel recuerda al hallado en cresta ilíaca (Engelstad ME et al. 2010). El segundo motivo es que dichas localizaciones se encuentran en un área anatómica bien conocida y de fácil accesibilidad, por lo que diseñar una técnica sencilla y segura para la punción y aspiración de médula ósea es factible. El último motivo es que en la literatura no existen apenas estudios que describan la presencia de CTM a dicho nivel

(Chung SM et al. 2008; Beitzel K et al. 2012; Kruger JP et al. 2012), y dado el posible potencial de éstas áreas consideramos necesaria esta investigación.

El aspecto macroscópico del hueso esponjoso de las metáfisis alrededor de la rodilla de fémur y tibia sugiere un alto contenido en médula ósea amarilla, o grasa, a diferencia de localizaciones como la cresta ilíaca, el húmero proximal o la vértebra, donde presenta un aspecto más hemático (médula ósea roja o hematopoyética). Al tratarse de médula ósea grasa, y existir un menor número de progenitores hematopoyéticos, sería lógico pensar que probablemente la presencia de células troncales mesenquimales sería también menor.

Sin embargo son muchos los estudios que avalan la efectividad de la metáfisis proximal de tibia como zona donante de hueso esponjoso en el tratamiento de pseudoartrosis, y la capacidad de la metáfisis distal de fémur para la integración de aloinjertos de gran tamaño, lo que podría estar en relación con la presencia de CTM a dicho nivel.

Las razones para realizar el estudio en el contexto de una cirugía de reemplazo articular son fundamentalmente la gran disponibilidad de pacientes, el aprovechamiento de recursos y minimizar la iatrogenia causada por la extracción de las muestras. Al tomar las muestras previo a la cirugía protésica, se aprovecha el ambiente estéril de quirófano y el entorno de seguridad ante posibles complicaciones. Al realizar las punciones bajo los efectos de la anestesia epidural, y sobre la incisión planificada para la cirugía, prácticamente la única iatrogenia añadida es la provocada por la punción en cresta ilíaca.



Como precedentes al estudio de la presencia de CTM en localizaciones cercanas a la rodilla existen muy pocos trabajos. Quizás el trabajo más parecido lo podemos encontrar en una publicación muy reciente realizada por Knut Beitzel y colaboradores (Beitzel K et al. 2012). En dicho trabajo analizan las CTM de médula ósea de metáfisis distal de fémur obtenidas durante cirugía de ligamentoplastia de cruzado anterior. La punción se realiza guiada por artroscopia a nivel de la escotadura femoral. En este estudio la caracterización de células troncales mesenquimales únicamente se realizó mediante la detección UFC (unidades formadoras de colonias) positivas en la tinción para fosfatasa alcalina, la detección de RNA para marcadores óseos y diferenciación positiva a osteoblastos. No obstante no se realiza punción sobre tibia, ni un análisis comparativo con la cresta ilíaca.

Otro trabajo reseñable es el realizado por Laura De Girolamo y colaboradores (de Girolamo L et al. 2010). Su estudio se realiza sobre pacientes con lesiones osteocondrales de rodilla. Obtienen aspirados de médula ósea a partir de las microperforaciones realizadas sobre las lesiones tanto de fémur como de tibia. Posteriormente cubren las lesiones con una matriz de colágeno embebida con las CTM obtenidas a partir de los aspirados. Independientemente de los resultados obtenidos este estudio también demuestra la presencia de CTM en fémur distal y tibia proximal, aunque los aspirados son realizados sobre hueso subcondral y no a nivel metafisario propiamente dicho.

## 5.2 Análisis de los resultados

La técnica para la obtención de los aspirados de médula ósea a nivel de la rodilla mostró ser eficaz. Excepto una punción tibial y por causas desconocidas, la técnica permitió obtener la cantidad deseada de médula ósea. No se observaron complicaciones durante el procedimiento de punción de cresta ilíaca, fémur y tibia, ni durante la estancia hospitalaria. Dichas complicaciones fueron entendidas como; fallo del material, daño neurovascular, o errores en la localización y punción del área objetivo. No se registraron infecciones de herida quirúrgica, hematomas extensos o una mayor demanda analgésica de la habitual. Lamentablemente el contexto quirúrgico del paciente no permitió la valoración del dolor debido a las punciones en fémur y tibia.

Las referencias anatómicas (polo superior de rótula, tuberosidad tibial anterior y EIAS) pudieron ser localizadas fácilmente mediante palpación incluso en pacientes obesos. A nivel de fémur y tibia, el gran tamaño de las metáfisis y la distancia hasta estructuras vasculonerviosas cercanas permitieron realizar las punciones con un gran margen de seguridad. Aunque las muestras fueron tomadas siempre por un único investigador (JN), la sensación subjetiva es que la técnica para punción a nivel de la rodilla es menos demandante y más segura que la punción de cresta ilíaca por vía anterior.

Otra ventajas añadida a la técnica de punción sobre fémur distal y tibia proximal es la accesibilidad de esta área anatómica. El paciente puede ser posicionado en decúbito supino y el área de punción puede ser fácilmente

accesible durante otros procedimientos quirúrgicos. Aunque el diseño del estudio no ha permitido realizar esta comprobación, creemos que, al menos, la punción de tibia puede ser realizada únicamente con anestesia local y de manera ambulatoria.

En el presente estudio las punciones se realizaron sobre la línea media para hacerlas coincidir con la incisión programada para piel. En un terreno práctico proponemos que la punción para tibia se realizase a un nivel más medial, sobre la cara anteromedial aplanada de la tibia para evitar daños sobre la tuberosidad tibial anterior o el tendón rotuliano. La punción femoral proponemos realizarla en un punto más lateral unos 5 cm proximales al epicóndilo externo, para evitar daños sobre el tendón cuadriceps y la articulación femoropatelar, aunque de este modo seguiríamos sin evitar el trayecto intraarticular del trócar, lo cual es una gran desventaja de esta técnica por presentar riesgo de artritis séptica o hemartros. No obstante el punto de entrada a las metáfisis no debería influir en la calidad de la muestra obtenida.

Hemos demostrado la presencia de células troncales mesenquimales en los aspirados de médula ósea de fémur y tibia, al igual que ocurre en cresta ilíaca, confirmando su estirpe mediante el cumplimiento de los tres requisitos mínimos propuestos por la ISCT (Dominici M et al. 2006):

En primer lugar, las células demostraron su capacidad para adhesión al plástico durante el proceso de cultivo, pudiendo visualizar al microscopio cómo éstas tapizaban la superficie del frasco de cultivo, mientras que las células que

no poseían dicha capacidad eran eliminadas por decantación en los sucesivos cambios de medio.

En segundo lugar el fenotipo mostrado por las células analizadas al final del cultivo también cumple con el propuesto por la ISCT. Las células aisladas de fémur y tibia mostraban un patrón negativo para los marcadores hematopoyéticos CD34, CD45, CD14 y CD19, así como ausencia de expresión de HLA-DR. De igual manera presentaban positividad para CD90, CD73 y CD105.

Por último, las células procedentes de fémur y tibia cultivadas en medios de inducción mostraron en todos los casos diferenciación satisfactoria hacia grasa, hueso y cartílago. Dicha diferenciación fue demostrada por medio de tinciones específicas y visualización al microscopio.

Basándonos en estos resultados podemos afirmar la presencia de células troncales mesenquimales en médula ósea de metáfisis distal de fémur y metáfisis proximal de tibia.

En el análisis fenotípico realizado sobre las células de la médula ósea (sangre total) mostró de manera significativa un mayor porcentaje de células CD34+ en cresta ilíaca respecto a fémur y tibia. El marcador CD34 es propio de las células troncales hematopoyéticas (Mackie AR et al. 2011). Este dato parece confirmar la diferencia entre la médula ósea roja (hematopoyética) encontrada

en la cresta ilíaca y la médula ósea amarilla (o grasa) observada en fémur distal y tibia proximal.

El análisis también observó diferencias estadísticamente significativas siendo mayor la proporción de células CD133+ en cresta ilíaca. Este marcador se encuentra tanto en las células troncales hematopoyéticas como en las células troncales endoteliales (Tondreau T et al. 2005; Chao H et al. 2010). Sin embargo no se apreciaron diferencias significativas en cuanto a la expresión de VEGF ni CD105 entre las tres localizaciones. Estas dos moléculas tienen un importante papel en el desarrollo del sistema vascular y están presentes en los mecanismos de angiogénesis (Distler JH et al. 2003; Lopez-Novoa JM et al. 2010). Estos hallazgos podrían explicar los efectos beneficiosos de la infiltración con concentrados de médula ósea de cresta ilíaca para el tratamiento de enfermedades como la pseudoartrosis. No obstante son necesarios más estudios para poder realizar tal afirmación y no es el objeto de estudio del presente trabajo.

Respecto a las células troncales mesenquimales, además de analizar los antígenos de membrana requeridos por la ISCT, realizamos estudio de otros marcadores. Encontramos un patrón constante en las muestras de CTM de cresta, fémur y tibia, siendo todas las células positivas para VEGF y CD71 (receptor de transferrina, presente en células en proliferación) e invariablemente negativas para CD133 y CD117 (marcadores de células troncales hematopoyéticas y endoteliales).

Dada la constancia del patrón expresado por las CTM de nuestro estudio pensamos que, tanto la expresión de VEGF y CD71, como la ausencia de CD133 y CD117 podrían añadirse a la batería de marcadores propuesta por la ISCT para una mejor caracterización de las células troncales mesenquimales de médula ósea.

Diversos estudios estiman que las células troncales mesenquimales se encuentran en una proporción de 1 por cada 10.000 a 100.000 células mononucleadas de la médula ósea (Brinchmann JE 2008; Jones E et al. 2008; Kasten P et al. 2008; Lubis AM et al. 2011). En base a estos estudios, el recuento de CMN nos da una estimación aproximada del número de CTM que podemos hallar en una muestra de médula ósea. La concentración de CMN es el método habitualmente más empleado en los trabajos científicos para indicar la riqueza en CTM en médula ósea (Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, et al. 2005; Mazzocca AD et al. 2011). Para realizar un recuento directo de las MSC en médula ósea virgen son necesarios hemocitómetros muy avanzados y de elevado coste. Algunos autores en sus artículos emplean la expresión de fosfatasa alcalina para, por medio de tinciones, realizar un recuento directo (McLain RF et al. 2009; Mazzocca AD et al. 2011; Beitzel K et al. 2012). Lamentablemente, se ha visto que dicho marcador no está presente en las CTM hasta que no se encuentran en las fases precoces de diferenciación hacia el linaje osteoblástico, por lo que dicho método puede dar valores de recuento inexactos (Flores-Figueroa 2006). Por ello, en nuestro estudio sólo se realizó recuento de las CMN en médula ósea total, ya que pensamos que es el método más fiable con los medios disponibles.

El análisis de la celularidad puso de manifiesto diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la concentración de células mononucleadas en la médula ósea de las tres localizaciones siendo claramente superior en cresta ilíaca ( $p < 0,05$ ). Encontramos una concentración media de  $10 \times 10^6$  CMN/ml en cresta ilíaca frente a una media de  $4,5 \times 10^6$  CMN/ml en fémur y  $4,1 \times 10^6$  CMN/ml en tibia. Frente a estos hallazgos es probable que la concentración de CTM en la médula ósea de fémur y tibia también sea menor que en cresta ilíaca.

A nivel de la rodilla, el único estudio que permite realizar un análisis comparativo con este trabajo es el realizado en metáfisis distal de fémur por Knut Beitzel y colaboradores en 2012. Realizan punción-aspiración de médula ósea de fémur distal durante cirugía artroscópica. En su estudio hallan una concentración media de  $13,5 \times 10^6$  CMN/ml (Beitzel K et al. 2012).

A la hora de comparar nuestros resultados en fémur distal y tibia proximal con la médula ósea de otras localizaciones estudiadas en la literatura también encontramos resultados muy diferentes.

Los estudios previamente mencionados realizados en cuerpo vertebral por McLain y colaboradores (McLain RF et al. 2005), en aspirados obtenidos en 8 pacientes durante cirugía de columna por medio de punción transpedicular encuentran en cuerpo vertebral una concentración media de  $21 \times 10^6$  CMN/ml. En un estudio posterior, los mismos autores (McLain RF et al. 2009) confirman la presencia de una alta concentración de CTM en cuerpo vertebral y realizan un análisis comparativo con cresta ilíaca. No obstante en dicho estudio no

especifican las concentraciones de CMN halladas por lo que no es posible comparar resultados.

También se ha mencionado previamente los estudios realizados por Mazzocca y colaboradores a nivel de húmero proximal (Mazzocca AD et al. 2010; Mazzocca AD et al. 2011). Publican los resultados de dos estudios consecutivos realizados en 2010 y 2011. Obtienen aspirados de médula ósea de cabeza humeral de 23 pacientes durante cirugía artroscópica de reparación de manguito rotador. En ambos estudios encuentran una concentración media de  $16,1 \times 10^6$  CMN/ml y  $12,1 \times 10^6$  CMN/ml

Partiendo del mismo número de células plantadas en los cultivos (no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en cuanto a *nº células plantadas*), hemos podido observar que el número de CTM obtenidas al final de los cultivos no presentaba diferencias estadísticamente significativas entre las tres localizaciones. Esto parece indicar que la capacidad replicativa de las CTM de las tres localizaciones es muy similar.

No obstante, y pese a que no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la viabilidad de éstas células, los cultivos de fémur y tibia presentaron peor evolución que los de cresta ilíaca. La tasa de éxito de los cultivos de cresta ilíaca fue del 90% frente al 70,6% de fémur y 50% de tibia. Los cultivos desechados fueron detenidos por no observarse expansión celular en el tiempo.



Realizando un análisis estadístico no se halló correlación significativa entre la concentración celular y el éxito del cultivo, la edad o la viabilidad de las células. Desconocemos el motivo que ha provocado el fracaso de estos cultivos de tibia y fémur. Lo más probable es que las CTM presentes en dichos cultivos se encontrasen en fase de senescencia. También es probable que en el microambiente de la médula ósea de cresta ilíaca exista una mayor actividad de moléculas coestimuladoras y relaciones célula-célula, que no se dan al mismo nivel en las metáfisis distal de fémur y proximal de tibia.

Esta observación también se ha visto reflejada en el estudio de Chung y colaboradores (Chung SM et al. 2008), en el que realizan un análisis comparativo de médula ósea obtenida de metáfisis tibial proximal con cresta ilíaca. Las muestras fueron tomadas de tibia durante cirugía de artrodesis lumbar, aunque no especifican la técnica empleada. En su estudio obtuvieron 7 muestras de tibia. Las 7 muestras presentaron mala evolución en el cultivo con ausencia de expansión y fracaso de los cultivos. En dicho estudio tampoco encontraron una relación entre la edad o la concentración celular, por lo que el motivo de este fracaso tampoco queda esclarecido.

Respecto a la capacidad terapéutica de las CTM, son muy pocos los ensayos clínicos que investiguen el número necesario de células progenitoras necesarias para obtener una respuesta satisfactoria al tratamiento.

Quizá el ensayo clínico que refleje esta cuestión con mayor claridad es el realizado por Hernigou y colaboradores. Realizan un ensayo sobre 60

pacientes con pseudoartrosis atrófica de tibia. En su estudio realizan aspirados de M.O de cresta ilíaca e infunden un concentrado de dicho aspirado en el foco de pseudoartrosis. Describen con gran claridad que aquellos pacientes que recibieron menos de 30.000 células troncales mesenquimales no respondían satisfactoriamente al tratamiento. Este estudio pone de manifiesto que existe una relación entre la concentración de células progenitoras implantadas y su efecto terapéutico. (Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, et al. 2005).

Otros estudios sobre osteogénesis imperfecta establecen este nivel mínimo en  $1 \times 10^6$  CTM/Kg de peso del paciente para el tratamiento mediante infusión venosa, o estudios sobre infarto de miocardio estableciendo el número mínimo en  $1 \times 10^6$  CTM mediante infusión intracoronaria (Horwitz EM et al. 2002; Chen SL et al. 2004). El número necesario de células progenitoras para llevar a cabo estos tratamientos requiere la extracción de grandes volúmenes de médula ósea o la expansión celular en laboratorio hasta alcanzar la cantidad deseada.

Para valorar el posible potencial terapéutico de las fuentes estudiadas en este trabajo, la metáfisis distal de fémur y proximal de tibia, sería necesario realizar un ensayo clínico determinando el volumen de médula ósea que se puede extraer y los efectos de las CTM en el tratamiento.

En base a los hallazgos de este estudio, podemos concluir que la médula ósea de metáfisis distal de fémur y metáfisis proximal de tibia contienen células troncales mesenquimales. Éstas células poseen características similares a las CTM halladas en médula ósea de cresta ilíaca, dado que han demostrado tener

un patrón fenotípico similar para los marcadores analizados en este estudio, una capacidad de replicación similar, y potencial para diferenciación hacia grasa, hueso y cartílago.

No obstante, pese a que éstas células presentan características similares en las tres localizaciones, el estudio de la densidad de CMN de la médula ósea mostró diferencias significativas. La concentración de células mononucleadas en metáfisis distal de fémur y metáfisis proximal de tibia en este estudio es aproximadamente la mitad que la encontrada en cresta ilíaca.

También se puede observar que la tasa de éxito para los cultivos es sensiblemente menor para las muestras de fémur y tibia, aunque desconocemos los motivos que puedan ser la causa de este efecto.

### **5.3 Relevancia clínica**

La técnica descrita para la obtención de aspirados de médula ósea es segura y eficaz, aunque, dada la ausencia de diferencias significativas en cuanto a los hallazgos entre fémur y tibia recomendamos la punción tibial, ya que presenta menor riesgo (artritis séptica, daño articular).

Éste es el primer estudio en analizar las células troncales mesenquimales de las metáfisis distal de fémur y proximal de tibia y compararlas con las de cresta ilíaca, así como en describir una técnica para punción y aspiración de forma percutánea en esta zona. Aunque dicha técnica permite obtener células troncales mesenquimales de características similares a las halladas en cresta

ilíaca, en un número suficiente para cultivo, es necesario realizar un estudio para valorar la eficacia terapéutica de estas nuevas fuentes.

#### 5.4 Limitaciones del estudio

Las limitaciones del estudio son diversas y atañen aspectos relacionados tanto con la población del estudio como con los métodos empleados:

- La limitación fundamental del estudio es la edad avanzada de nuestros pacientes. Aunque existe controversia en la literatura son claros los efectos de la edad sobre el número y actividad de las células troncales mesenquimales, por lo que puede haber influido en gran manera en los resultados obtenidos.
- Otra limitación es que el estudio se ha realizado comparando cresta ilíaca sana con una rodilla “enferma”. El hecho de que una rodilla padezca gonartrosis puede alterar el microambiente de la médula ósea a dicho nivel y afectar no sólo al número de células presentes, sino a su actividad o naturaleza.
- El bajo volumen de médula ósea extraído para cada muestra en ocasiones no permitió realizar todos los procedimientos de laboratorio previstos.
- Pese a que el análisis de la concentración de CMN nos da una estimación de la concentración de CTM, dicha estimación es muy variable. Hubiera sido interesante realizar un conteo directo del número de CTM en médula ósea previo a los cultivos.

- Aunque los métodos para confirmar la diferenciación positiva hacia grasa, hueso y tendón mediante las tinciones descritas en el estudio están ampliamente validadas hubiera sido interesante realizar un análisis de PCR en transcripción reversa para una determinación más fiable. Así mismo también hubiera podido determinarse dicha diferenciación mediante tinciones inmunohistoquímicas, como tinciones para colágeno tipo II por ejemplo.
- Respecto a la técnica para punción aspiración, la punción de fémur presenta serios inconvenientes. La desventaja fundamental es el trayecto intraarticular de la aguja, que puede conducir a complicaciones serias como el desarrollo de una artritis séptica, hemartros o daño de la articulación patelofemoral. Al no detectarse diferencias significativas en el estudio entre fémur y tibia se recomienda la punción tibial frente a la femoral.
- Al realizar el estudio en pacientes con intervención de artroplastia total de rodilla es imposible valorar la iatrogenia causada por las punciones en fémur y tibia, siendo imposible discriminar si la presencia de dolor, hematomas o hemartros es debida a la cirugía o a la punción.

## 6. CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

1. La técnica descrita para la obtención de aspirados de médula ósea en metáfisis distal de fémur y proximal de tibia demostró ser eficaz y sencilla. A pesar de no haberse presentado ninguna complicación, la técnica de punción en tibia sería preferible en la práctica clínica, dado el mayor riesgo teórico de la técnica descrita para la punción femoral.
2. La concentración de células mononucleadas en la médula ósea fue significativamente superior en cresta ilíaca respecto a fémur y tibia. En cambio, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en la concentración de células mononucleadas en los aspirados de médula ósea de metáfisis distal de fémur respecto a metáfisis proximal de tibia.
3. Se confirma la presencia de células troncales mesenquimales en médula ósea de metáfisis distal de fémur y metáfisis proximal de tibia, dado que las células encontradas cumplen con los requisitos mínimos establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular para poder ser consideradas células troncales mesenquimales.
4. Las células troncales mesenquimales halladas en médula ósea de metáfisis distal de fémur y metáfisis proximal de tibia, presentan un fenotipo, capacidad de replicación, y potencial de diferenciación hacia grasa, hueso y cartílago similares al presentado por las células troncales mesenquimales de médula ósea de cresta ilíaca.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA

Por orden alfabético:

- Amer ME, El-Sayed SZ, El-Kheir WA, Gabr H, Gomaa AA, El-Noomani N, et al. "Clinical and laboratory evaluation of patients with end-stage liver cell failure injected with bone marrow-derived hepatocyte-like cells." *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2011; 23(10): 936-941.
- Angele P, Yoo JU, Smith C, Mansour J, Jepsen KJ, Nerlich M, et al. "Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated in vitro." *J Orthop Res*, 2003; 21(3): 451-457.
- Arima N, Nakamura F, Fukunaga A, Hirata H, Machida H, Kouno S, et al. "Single intra-arterial injection of mesenchymal stromal cells for treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease: a pilot study." *Cytotherapy*, 2010; 12(2): 265-268.
- Arthur A, Zannettino A, Gronthos S. "The therapeutic applications of multipotential mesenchymal/stromal stem cells in skeletal tissue repair." *J Cell Physiol*, 2009; 218(2): 237-245.
- Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A, Owen M. "Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo." *Clin Orthop Relat Res*, 1980;(151): 294-307.
- Ayatollahi M, Soleimani M, Tabei SZ, Kabir Salmani M. "Hepatogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced by insulin like growth factor-I." *World J Stem Cells*, 2011; 3(12): 113-121.
- Azouna NB, Jenhani F, Regaya Z, Berraeis L, Othman TB, Ducrocq E, et al. "Phenotypical and functional characteristics of mesenchymal stem cells from bone marrow: comparison of culture using different media supplemented with human platelet lysate or fetal bovine serum." *Stem Cell Res Ther*, 2012; 3(1): 6.
- Bae KS, Park JB, Kim HS, Kim DS, Park DJ, Kang SJ. "Neuron-like differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells." *Yonsei Med J*, 2011; 52(3): 401-412.
- Bain BJ. "Bone marrow biopsy morbidity: review of 2003." *J Clin Pathol*, 2005; 58(4): 406-408.
- Barry FP. "Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells." *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2003; 69(3): 250-256.
- Barry FP, Murphy JM, English K, Mahon BP. "Immunogenicity of adult mesenchymal stem cells: lessons from the fetal allograft." *Stem Cells Dev*, 2005; 14(3): 252-265.
- Beitzel K, McCarthy MB, Cote MP, Chowaniec D, Falcone LM, Falcone JA, et al. "Rapid isolation of human stem cells (connective progenitor cells) from the distal femur during arthroscopic knee surgery." *Arthroscopy*, 2012; 28(1): 74-84.
- Bensidhoum M, Chapel A, Francois S, Demarquay C, Mazurier C, Fouillard L, et al. "Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem

- cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment." *Blood*, 2004; 103(9): 3313-3319.
- Bernardo ME, Avanzini MA, Perotti C, Cometa AM, Moretta A, Lenta E, et al. "Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute." *J Cell Physiol*, 2007; 211(1): 121-130.
- Bhanot Y, Rao S, Ghosh D, Balaraju S, Radhika CR, Satish Kumar KV. "Autologous mesenchymal stem cells in chronic spinal cord injury." *Br J Neurosurg*, 2011; 25(4): 516-522.
- Bieback K, Schallmoser K, Kluter H, Strunk D. "Clinical Protocols for the Isolation and Expansion of Mesenchymal Stromal Cells." *Transfus Med Hemother*, 2008; 35(4): 286-294.
- Blocklet D, Tounouz M, Berkenboom G, Lambermont M, Unger P, Preumont N, et al. "Myocardial homing of nonmobilized peripheral-blood CD34+ cells after intracoronary injection." *Stem Cells*, 2006; 24(2): 333-336.
- Brinchmann JE. "Expanding autologous multipotent mesenchymal bone marrow stromal cells." *J Neurol Sci*, 2008; 265(1-2): 127-130.
- Buhring HJ, Battula VL, Treml S, Schewe B, Kanz L, Vogel W. "Novel markers for the prospective isolation of human MSC." *Ann N Y Acad Sci*, 2007; 1106: 262-271.
- Buhring HJ, Treml S, Cerabona F, de Zwart P, Kanz L, Sobiesiak M. "Phenotypic characterization of distinct human bone marrow-derived MSC subsets." *Ann N Y Acad Sci*, 2009; 1176: 124-134.
- Caplan AI. "Cell and molecular strategies for massive bone repair/regeneration." *Nihon Seikeigeka Gakkai Zasshi*, 1989; 63(5): 692-699.
- Caplan AI. "The mesengenic process." *Clin Plast Surg*, 1994; 21(3): 429-435.
- Centeno CJ, Busse D, Kisiday J, Keohan C, Freeman M, Karli D. "Regeneration of meniscus cartilage in a knee treated with percutaneously implanted autologous mesenchymal stem cells." *Med Hypotheses*, 2008; 71(6): 900-908.
- Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. "Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing." *Stem Cells*, 2007; 25(11): 2739-2749.
- Chao H, Hirschi KK. "Hemato-vascular origins of endothelial progenitor cells?" *Microvasc Res*, 2010; 79(3): 169-173.
- Charge SB, Rudnicki MA. "Cellular and molecular regulation of muscle regeneration." *Physiol Rev*, 2004; 84(1): 209-238.
- Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, et al. "Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction." *Am J Cardiol*, 2004; 94(1): 92-95.
- Chung SM, Kim EB, Park SY, Sung MC, Youn HK, Ahn MW. "Effect of bone marrow cell collection techniques and donor site locations on in-vitro growth of bone forming cells." *Asian Spine J*, 2008; 2(2): 59-63.
- Ciccocioppo R, Bernardo ME, Sgarella A, Maccario R, Avanzini MA, Ubezio C, et al. "Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease." *Gut*, 2011; 60(6): 788-798.
- Connolly J, Guse R, Lippiello L, Dehne R. "Development of an osteogenic bone-marrow preparation." *J Bone Joint Surg Am*, 1989; 71(5): 684-691.

- de Girolamo L, Bertolini G, Cervellin M, Sozzi G, Volpi P. "Treatment of chondral defects of the knee with one step matrix-assisted technique enhanced by autologous concentrated bone marrow: in vitro characterisation of mesenchymal stem cells from iliac crest and subchondral bone." *Injury*, 2010; 41(11): 1172-1177.
- Dexheimer V, Mueller S, Braatz F, Richter W. "Reduced reactivation from dormancy but maintained lineage choice of human mesenchymal stem cells with donor age." *PLoS One*, 2011; 6(8): e22980.
- Dimitriou R, Mataliotakis GI, Angoules AG, Kanakaris NK, Giannoudis PV. "Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: a systematic review." *Injury*, 2011; 42 Suppl 2: S3-15.
- Distler JH, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, Gay RE, Gay S, Distler O. "Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis." *Q J Nucl Med*, 2003; 47(3): 149-161.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." *Cytotherapy*, 2006; 8(4): 315-317.
- Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Llense JR, Begot L, Holy X, et al. "Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications." *J Cell Physiol*, 2005; 205(2): 228-236.
- Duijvestein M, Vos AC, Roelofs H, Wildenberg ME, Wendrich BB, Verspaget HW, et al. "Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study." *Gut*, 2010; 59(12): 1662-1669.
- Engelstad ME, Morse T. "Anterior iliac crest, posterior iliac crest, and proximal tibia donor sites: a comparison of cancellous bone volumes in fresh cadavers." *J Oral Maxillofac Surg*, 2010; 68(12): 3015-3021.
- Erices A, Conget P, Rojas C, Minguell JJ. "Gp130 activation by soluble interleukin-6 receptor/interleukin-6 enhances osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells." *Exp Cell Res*, 2002; 280(1): 24-32.
- Flores-Figueroa. "Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica." *Revista de investigación clínica*, 2006; 58(5): 498-511.
- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. "Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers." *Cell Tissue Kinet*, 1987; 20(3): 263-272.
- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. "Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo." *Transplantation*, 1974; 17(4): 331-340.
- Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. "Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues." *Transplantation*, 1968; 6(2): 230-247.
- Garvin K, Feschuk C, Sharp JG, Berger A. "Does the number or quality of pluripotent bone marrow stem cells decrease with age?" *Clin Orthop Relat Res*, 2007; 465: 202-207.

- Geideman W, Early JS, Brodsky J. "Clinical results of harvesting autogenous cancellous graft from the ipsilateral proximal tibia for use in foot and ankle surgery." *Foot Ankle Int*, 2004; 25(7): 451-455.
- Ghannam S, Bouffi C, Djouad F, Jorgensen C, Noel D. "Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications." *Stem Cell Res Ther*, 2010; 1(1): 2.
- Gladden K, Spill GR. "Iliac fracture after a bone marrow biopsy." *PM R*, 2011; 3(12): 1150-1152.
- Goel A, Sangwan SS, Siwach RC, Ali AM. "Percutaneous bone marrow grafting for the treatment of tibial non-union." *Injury*, 2005; 36(1): 203-206.
- Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. "Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies." *Bone*, 1992; 13(1): 69-80.
- Herbertson A, Aubin JE. "Cell sorting enriches osteogenic populations in rat bone marrow stromal cell cultures." *Bone*, 1997; 21(6): 491-500.
- Herford AS, King BJ, Audia F, Becktor J. "Medial approach for tibial bone graft: anatomic study and clinical technique." *J Oral Maxillofac Surg*, 2003; 61(3): 358-363.
- Hernandez J, Torres-Espin A, Navarro X. "Adult stem cell transplants for spinal cord injury repair: current state in preclinical research." *Curr Stem Cell Res Ther*, 2011; 6(3): 273-287.
- Hernigou P, Beaujean F. "Abnormalities in the bone marrow of the iliac crest in patients who have osteonecrosis secondary to corticosteroid therapy or alcohol abuse." *J Bone Joint Surg Am*, 1997; 79(7): 1047-1053.
- Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H. "Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells." *J Bone Joint Surg Am*, 2005; 87(7): 1430-1437.
- Hernigou P, Poignard A, Manicom O, Mathieu G, Rouard H. "The use of percutaneous autologous bone marrow transplantation in nonunion and avascular necrosis of bone." *J Bone Joint Surg Br*, 2005; 87(7): 896-902.
- Herzog EL, Chai L, Krause DS. "Plasticity of marrow-derived stem cells." *Blood*, 2003; 102(10): 3483-3493.
- Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, et al. "Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002; 99(13): 8932-8937.
- Howlett CR, Cave J, Williamson M, Farmer J, Ali SY, Bab I, et al. "Mineralization in vitro cultures of rabbit marrow stromal cells." *Clin Orthop Relat Res*, 1986;(213): 251-263.
- Huang Q, Zhang H, Pei FX, Chen ZY, Wang GL, Shen B, et al. "Use of small interfering ribonucleic acids to inhibit the adipogenic effect of alcohol on human bone marrow-derived mesenchymal cells." *Int Orthop*, 2010; 34(7): 1059-1068.
- Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. "Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro." *J Cell Biochem*, 1997; 64(2): 295-312.
- Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. "Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging." *Exp Hematol*, 2004; 32(5): 414-425.

- Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. "In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells." *Exp Cell Res*, 1998; 238(1): 265-272.
- Jones E, McGonagle D. "Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo." *Rheumatology (Oxford)*, 2008; 47(2): 126-131.
- Karnieli O, Izhar-Prato Y, Bulvik S, Efrat S. "Generation of insulin-producing cells from human bone marrow mesenchymal stem cells by genetic manipulation." *Stem Cells*, 2007; 25(11): 2837-2844.
- Karussis D, Karageorgiou C, Vaknin-Dembinsky A, Gowda-Kurkalli B, Gomori JM, Kassis I, et al. "Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis." *Arch Neurol*, 2010; 67(10): 1187-1194.
- Kasten P, Beyen I, Egermann M, Suda AJ, Moghaddam AA, Zimmermann G, et al. "Instant stem cell therapy: characterization and concentration of human mesenchymal stem cells in vitro." *Eur Cell Mater*, 2008; 16: 47-55.
- Katrakis DG, Sotiropoulou PA, Karvouni E, Karabinos I, Korovesis S, Perez SA, et al. "Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium." *Catheter Cardiovasc Interv*, 2005; 65(3): 321-329.
- Kerr EJ, Jawahar A, Wooten T, Kay S, Cavanaugh DA, Nunley PD. "The use of osteoconductive stem-cells allograft in lumbar interbody fusion procedures: an alternative to recombinant human bone morphogenetic protein." *J Surg Orthop Adv*, 2011; 20(3): 193-197.
- Kim MR, Jeon ES, Kim YM, Lee JS, Kim JH. "Thromboxane a(2) induces differentiation of human mesenchymal stem cells to smooth muscle-like cells." *Stem Cells*, 2009; 27(1): 191-199.
- Kon E, Muraglia A, Corsi A, Bianco P, Marcacci M, Martin I, et al. "Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones." *J Biomed Mater Res*, 2000; 49(3): 328-337.
- Kovar FM, Wozasek GE. "Bone graft harvesting using the RIA (reaming irrigation aspirator) system - a quantitative assessment." *Wien Klin Wochenschr*, 2011; 123(9-10): 285-290.
- Kruger JP, Endres M, Neumann K, Stuhlmüller B, Morawietz L, Haupl T, et al. "Chondrogenic differentiation of human subchondral progenitor cells is affected by synovial fluid from donors with osteoarthritis or rheumatoid arthritis." *J Orthop Surg Res*, 2012; 7: 10.
- Ku CH, Johnson PH, Batten P, Sarathchandra P, Chambers RC, Taylor PM, et al. "Collagen synthesis by mesenchymal stem cells and aortic valve interstitial cells in response to mechanical stretch." *Cardiovasc Res*, 2006; 71(3): 548-556.
- Le Blanc K, Frasson F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. "Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study." *Lancet*, 2008; 371(9624): 1579-1586.
- Le Blanc K, Samuelsson H, Gustafsson B, Remberger M, Sundberg B, Arvidson J, et al. "Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells." *Leukemia*, 2007; 21(8): 1733-1738.

- Lee HC, An SG, Lee HW, Park JS, Cha KS, Hong TJ, et al. "Safety and Effect of Adipose Tissue-Derived Stem Cell Implantation in Patients With Critical Limb Ischemia." *Circ J*, 2012.
- Lennon DP, Edmison JM, Caplan AI. "Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis." *J Cell Physiol*, 2001; 187(3): 345-355.
- Lezcano FJ, Cagigal BP, Cantera JM, de la Pena Varela G, Blanco RF, Hernandez AV. "Technical note: medial approach for proximal tibia bone graft using a manual trephine." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2007; 104(1): e11-17.
- Li M, Chan K, Cai D, Leung P, Cheng C, Lee K, et al. "Identification and purification of an intrinsic human muscle myogenic factor that enhances muscle repair and regeneration." *Arch Biochem Biophys*, 2000; 384(2): 263-268.
- Li X, Yu X, Lin Q, Deng C, Shan Z, Yang M, et al. "Bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into functional cardiac phenotypes by cardiac microenvironment." *J Mol Cell Cardiol*, 2007; 42(2): 295-303.
- Liao M, Ning L, Chen X, Li X, Luo J, Qin T. "[Strain-induced tenogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells]." *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 2010; 24(7): 817-821.
- Lopez-Novoa JM, Bernabeu C. "The physiological role of endoglin in the cardiovascular system." *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010; 299(4): H959-974.
- Lubis AM, Sandhow L, Lubis VK, Noor A, Gumay F, Merlina M, et al. "Isolation and cultivation of mesenchymal stem cells from iliac crest bone marrow for further cartilage defect management." *Acta Med Indones*, 2011; 43(3): 178-184.
- Luo Q, Song G, Song Y, Xu B, Qin J, Shi Y. "Indirect co-culture with tenocytes promotes proliferation and mRNA expression of tendon/ligament related genes in rat bone marrow mesenchymal stem cells." *Cytotechnology*, 2009; 61(1-2): 1-10.
- Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF. "Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow." *Tissue Eng*, 1998; 4(4): 415-428.
- Mackie AR, Losordo DW. "CD34-positive stem cells: in the treatment of heart and vascular disease in human beings." *Tex Heart Inst J*, 2011; 38(5): 474-485.
- Majumdar MK, Banks V, Peluso DP, Morris EA. "Isolation, characterization, and chondrogenic potential of human bone marrow-derived multipotential stromal cells." *J Cell Physiol*, 2000; 185(1): 98-106.
- Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR, et al. "Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells." *J Biomed Sci*, 2003; 10(2): 228-241.
- Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, Lavroukov A, Kutevov S, Quarto R, et al. "Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study." *Tissue Eng*, 2007; 13(5): 947-955.
- Martino M, Console G, Russo L, Messina G, D'Arro BL, Irrera G, et al. "Internal iliac artery perforation following bone marrow aspiration in a patient with no previously identified risk factors: a case report and review of the literature." *Acta Haematol*, 2012; 127(1): 23-25.

- Mazzini L, Mareschi K, Ferrero I, Miglioretti M, Stecco A, Servo S, et al. "Mesenchymal stromal cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: a long-term safety study." *Cytotherapy*, 2012; 14(1): 56-60.
- Mazzocca AD, McCarthy MB, Chowaniec D, Cote MP, Judson CH, Apostolakis J, et al. "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells obtained during arthroscopic rotator cuff repair surgery show potential for tendon cell differentiation after treatment with insulin." *Arthroscopy*, 2011; 27(11): 1459-1471.
- Mazzocca AD, McCarthy MB, Chowaniec DM, Cote MP, Arciero RA, Drissi H. "Rapid isolation of human stem cells (connective tissue progenitor cells) from the proximal humerus during arthroscopic rotator cuff surgery." *Am J Sports Med*, 2010; 38(7): 1438-1447.
- McGonagle D, Jones E. "A potential role for synovial fluid mesenchymal stem cells in ligament regeneration." *Rheumatology (Oxford)*, 2008; 47(8): 1114-1116.
- McLain RF, Boehm CA, Rufo-Smith C, Muschler GF. "Transpedicular aspiration of osteoprogenitor cells from the vertebral body: progenitor cell concentrations affected by serial aspiration." *Spine J*, 2009; 9(12): 995-1002.
- McLain RF, Fleming JE, Boehm CA, Muschler GF. "Aspiration of osteoprogenitor cells for augmenting spinal fusion: comparison of progenitor cell concentrations from the vertebral body and iliac crest." *J Bone Joint Surg Am*, 2005; 87(12): 2655-2661.
- Mizuno H. "Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review." *J Nihon Med Sch*, 2009; 76(2): 56-66.
- Mohajeri M, Farazmand A, Mohyeddin Bonab M, Nikbin B, Minagar A. "FOXP3 gene expression in multiple sclerosis patients pre- and post mesenchymal stem cell therapy." *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2011; 10(3): 155-161.
- Mohamadnejad M, Sohail MA, Watanabe A, Krause DS, Swenson ES, Mehal WZ. "Adenosine inhibits chemotaxis and induces hepatocyte-specific genes in bone marrow mesenchymal stem cells." *Hepatology*, 2010; 51(3): 963-973.
- Muschler GF, Boehm C, Easley K. "Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume." *J Bone Joint Surg Am*, 1997; 79(11): 1699-1709.
- Myeroff C, Archdeacon M. "Autogenous bone graft: donor sites and techniques." *J Bone Joint Surg Am*, 2011; 93(23): 2227-2236.
- Ning H, Yang F, Jiang M, Hu L, Feng K, Zhang J, et al. "The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study." *Leukemia*, 2008; 22(3): 593-599.
- Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhauser M, et al. "Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro." *Stem Cells*, 2004; 22(3): 377-384.
- Owen M, Friedenstein AJ. "Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors." *Ciba Found Symp*, 1988; 136: 42-60.
- Park BW, Kang EJ, Byun JH, Son MG, Kim HJ, Hah YS, et al. "In vitro and in vivo osteogenesis of human mesenchymal stem cells derived from skin, bone marrow and dental follicle tissues." *Differentiation*, 2012; 83(5): 249-259.

- Pascarella A, Ciatti R, Pascarella F, Latte C, Di Salvatore MG, Liguori L, et al. "Treatment of articular cartilage lesions of the knee joint using a modified AMIC technique." *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2010; 18(4): 509-513.
- Peng L, Xie DY, Lin BL, Liu J, Zhu HP, Xie C, et al. "Autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in liver failure patients caused by hepatitis B: short-term and long-term outcomes." *Hepatology*, 2011; 54(3): 820-828.
- Perez-Simon JA, Lopez-Villar O, Andreu EJ, Rifon J, Muntion S, Campelo MD, et al. "Mesenchymal stem cells expanded in vitro with human serum for the treatment of acute and chronic graft-versus-host disease: results of a phase I/II clinical trial." *Haematologica*, 2011; 96(7): 1072-1076.
- Perico N, Casiraghi F, Inrona M, Gotti E, Todeschini M, Cavinato RA, et al. "Autologous mesenchymal stromal cells and kidney transplantation: a pilot study of safety and clinical feasibility." *Clin J Am Soc Nephrol*, 2011; 6(2): 412-422.
- Phinney DG, Kopen G, Righter W, Webster S, Tremain N, Prockop DJ. "Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells." *J Cell Biochem*, 1999; 75(3): 424-436.
- Phinney DG, Prockop DJ. "Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views." *Stem Cells*, 2007; 25(11): 2896-2902.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." *Science*, 1999; 284(5411): 143-147.
- Pretzel D, Linss S, Rochler S, Endres M, Kaps C, Alsalameh S, et al. "Relative percentage and zonal distribution of mesenchymal progenitor cells in human osteoarthritic and normal cartilage." *Arthritis Res Ther*, 2011; 13(2): R64.
- Qian SW, Li X, Zhang YY, Huang HY, Liu Y, Sun X, et al. "Characterization of adipocyte differentiation from human mesenchymal stem cells in bone marrow." *BMC Dev Biol*, 2010; 10: 47.
- Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, et al. "Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells." *N Engl J Med*, 2001; 344(5): 385-386.
- Rasmusson I. "Immune modulation by mesenchymal stem cells." *Exp Cell Res*, 2006; 312(12): 2169-2179.
- Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lonnies H, et al. "Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease." *Transplantation*, 2006; 81(10): 1390-1397.
- Rosland GV, Svendsen A, Torsvik A, Sobala E, McCormack E, Immervoll H, et al. "Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation." *Cancer Res*, 2009; 69(13): 5331-5339.
- Ross AL, Leder DE, Weiss J, Izakovic J, Grichnik JM. "Genomic instability in cultured stem cells: associated risks and underlying mechanisms." *Regen Med*, 2011; 6(5): 653-662.





- Rubinstein MA. "Aspiration of bone marrow from the iliac crest; some technical and diagnostic advantages versus sternal aspiration." *Bull N Y Acad Med*, 1948; 24(6): 400.
- Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, et al. "Spontaneous human adult stem cell transformation." *Cancer Res*, 2005; 65(8): 3035-3039.
- Sanchez PL, Villa A, Sanz R, Dominguez M, Ludwig I, Fernandez ME, et al. "Present and future of stem cells for cardiovascular therapy." *Ann Med*, 2007; 39(6): 412-427.
- Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, et al. "Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro." *Exp Neurol*, 2000; 164(2): 247-256.
- Santa Maria L, Rojas CV, Minguell JJ. "Signals from damaged but not undamaged skeletal muscle induce myogenic differentiation of rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells." *Exp Cell Res*, 2004; 300(2): 418-426.
- Sanz-Ruiz R, Gutierrez Ibanes E, Arranz AV, Fernandez Santos ME, Fernandez PL, Fernandez-Aviles F. "Phases I-III Clinical Trials Using Adult Stem Cells." *Stem Cells Int*, 2010; 2010: 579142.
- Sarigianni M, Vlachaki E, Chissan S, Klonizakis F, Vetsiou E, Anastasiadou KI, et al. "Haematoma caused by bone marrow aspiration and trephine biopsy." *Hematol Rep*, 2011; 3(3): e25.
- Sawant A, Chanda D, Isayeva T, Tsuladze G, Garvey WT, Ponnazhagan S. "Noggin is a novel inducer of mesenchymal stem cell adipogenesis: implications for bone health and obesity." *J Biol Chem*, 2012.
- Schallmoser K, Rohde E, Reinisch A, Bartmann C, Thaler D, Drexler C, et al. "Rapid large-scale expansion of functional mesenchymal stem cells from unmanipulated bone marrow without animal serum." *Tissue Eng Part C Methods*, 2008; 14(3): 185-196.
- Schmitt A, van Griensven M, Imhoff AB, Buchmann S. "Application of stem cells in orthopedics." *Stem Cells Int*, 2012; 2012: 394962.
- Schneider PR, Buhrmann C, Mobasher A, Matis U, Shakibaei M. "Three-dimensional high-density co-culture with primary tenocytes induces tenogenic differentiation in mesenchymal stem cells." *J Orthop Res*, 2011; 29(9): 1351-1360.
- Seiler JG, Johnson J. "Iliac crest autogenous bone grafting: donor site complications." *J South Orthop Assoc*, 2000; 9(2): 91-97.
- Sensebe L, Bourin P, Tarte K. "Good manufacturing practices production of mesenchymal stem/stromal cells." *Hum Gene Ther*, 2011; 22(1): 19-26.
- Shahdadfar A, Fronsdal K, Haug T, Reinholt FP, Brinchmann JE. "In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability." *Stem Cells*, 2005; 23(9): 1357-1366.
- Sheehy EJ, Buckley CT, Kelly DJ. "Oxygen tension regulates the osteogenic, chondrogenic and endochondral phenotype of bone marrow derived mesenchymal stem cells." *Biochem Biophys Res Commun*, 2012; 417(1): 305-310.
- Shenag DS, Rastegar F, Petkovic D, Zhang BQ, He BC, Chen L, et al. "Mesenchymal Progenitor Cells and Their Orthopedic Applications: Forging a Path towards Clinical Trials." *Stem Cells Int*, 2010; 2010: 519028.

- Shim WS, Jiang S, Wong P, Tan J, Chua YL, Tan YS, et al. "Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells." *Biochem Biophys Res Commun*, 2004; 324(2): 481-488.
- Simmons PJ, Torok-Storb B. "Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1." *Blood*, 1991; 78(1): 55-62.
- Snykers S, De Kock J, Rogiers V, Vanhaecke T. "In vitro differentiation of embryonic and adult stem cells into hepatocytes: state of the art." *Stem Cells*, 2009; 27(3): 577-605.
- Song G, Luo Q, Xu B, Ju Y. "Mechanical stretch-induced changes in cell morphology and mRNA expression of tendon/ligament-associated genes in rat bone-marrow mesenchymal stem cells." *Mol Cell Biomech*, 2010; 7(3): 165-174.
- Sordi V, Melzi R, Mercalli A, Formicola R, Doglioni C, Tiboni F, et al. "Mesenchymal cells appearing in pancreatic tissue culture are bone marrow-derived stem cells with the capacity to improve transplanted islet function." *Stem Cells*, 2010; 28(1): 140-151.
- Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M. "Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells." *Stem Cells*, 2006; 24(2): 462-471.
- Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. "Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells." *Bone*, 2003; 33(6): 919-926.
- Stenderup K, Justesen J, Eriksen EF, Rattan SI, Kassem M. "Number and proliferative capacity of osteogenic stem cells are maintained during aging and in patients with osteoporosis." *J Bone Miner Res*, 2001; 16(6): 1120-1129.
- Strioga M, Viswanathan S, Darinkas A, Slaby O, Michalek J. "Same or Not the Same? Comparison of Adipose Tissue-Derived Versus Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem and Stromal Cells." *Stem Cells Dev*, 2012.
- Su ZY, Li Y, Zhao XL, Zhang M. "All-trans retinoic acid promotes smooth muscle cell differentiation of rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells." *J Zhejiang Univ Sci B*, 2010; 11(7): 489-496.
- Tarnok A, Ulrich H, Bocsi J. "Phenotypes of stem cells from diverse origin." *Cytometry A*, 2010; 77(1): 6-10.
- Teven CM, Greives M, Natale RB, Su Y, Luo Q, He BC, et al. "Differentiation of osteoprogenitor cells is induced by high-frequency pulsed electromagnetic fields." *J Craniofac Surg*, 2012; 23(2): 586-593.
- Tikkanen J, Leskela HV, Lehtonen ST, Vahasarja V, Melkko J, Ahvenjarvi L, et al. "Attempt to treat congenital pseudarthrosis of the tibia with mesenchymal stromal cell transplantation." *Cytotherapy*, 2010; 12(5): 593-604.
- Tondreau T, Meuleman N, Delforge A, Dejeneffe M, Leroy R, Massy M, et al. "Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity." *Stem Cells*, 2005; 23(8): 1105-1112.
- Tropel P, Platet N, Platel JC, Noel D, Albrieux M, Benabid AL, et al. "Functional neuronal differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells." *Stem Cells*, 2006; 24(12): 2868-2876.

- Venkataramana NK, Pal R, Rao SA, Naik AL, Jan M, Nair R, et al. "Bilateral transplantation of allogenic adult human bone marrow-derived mesenchymal stem cells into the subventricular zone of Parkinson's disease: a pilot clinical study." *Stem Cells Int*, 2012; 2012: 931902.
- Villaron EM, Almeida J, Lopez-Holgado N, Alcoceba M, Sanchez-Abarca LI, Sanchez-Guijo FM, et al. "Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation." *Haematologica*, 2004; 89(12): 1421-1427.
- Wakitani S, Saito T, Caplan AI. "Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine." *Muscle Nerve*, 1995; 18(12): 1417-1426.
- Wen Z, Zheng S, Zhou C, Wang J, Wang T. "Repair mechanisms of bone marrow mesenchymal stem cells in myocardial infarction." *J Cell Mol Med*, 2011; 15(5): 1032-1043.
- Williams AR, Hare JM. "Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease." *Circ Res*, 2011; 109(8): 923-940.
- Wislet-Gendebien S, Hans G, Leprince P, Rigo JM, Moonen G, Rogister B. "Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype." *Stem Cells*, 2005; 23(3): 392-402.
- Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L, Caplan AI, Goldberg VM, et al. "The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells." *J Bone Joint Surg Am*, 1998; 80(12): 1745-1757.
- Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K, et al. "Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors." *Anat Rec*, 2001; 264(1): 51-62.
- Zaim M, Karaman S, Cetin G, Isik S. "Donor age and long-term culture affect differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells." *Ann Hematol*, 2012.
- Zhao D, Cui D, Wang B, Tian F, Guo L, Yang L, et al. "Treatment of early stage osteonecrosis of the femoral head with autologous implantation of bone marrow-derived and cultured mesenchymal stem cells." *Bone*, 2012; 50(1): 325-330.
- Zouhary KJ. "Bone graft harvesting from distant sites: concepts and techniques." *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*, 2010; 22(3): 301-316, v.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JL, Mizuno H, et al. "Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells." *Mol Biol Cell*, 2002; 13(12): 4279-4295.
- Zulewski H. "Stem cells with potential to generate insulin-producing cells in man." *Swiss Med Wkly*, 2007; 137 Suppl 155: 60S-67S.

## 8. ANEXOS

## 8.1 DOCUMENTO ACREDITATIVO DE APROBACIÓN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

|  |  |   |   |
|--|--|---|---|
| <br>SaludMadrid | <b>Hospital General Universitario<br/>Gregorio Marañón</b><br><small>Comunidad de Madrid</small> | <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;"><b>OFICINA TÉCNICA - COMITÉ DE ÉTICA<br/>DEL HOSPITAL GREGORIO MARAÑÓN</b><br/><b>01 JUN. 2009</b><br/>LIDA N.º .....595.....</div> |  |
|--|--|---|---|

**DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA**

D. Fernando Díaz Otero, Presidente del **COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA - ÁREA 1**

**CERTIFICA**

Que ha evaluado la propuesta del promotor referida al estudio:

**TÍTULO:** "Presencia de células madre en médula ósea; estudio comparativo entre cresta ilíaca, epífisis distal de fémur y edifisis proximal de tibia"

**PROMOTOR:** Investigador

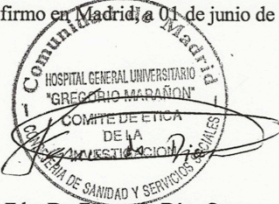
considera que :

- El estudio se plantea siguiendo los requisitos legalmente establecidos, y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.
- La capacidad del investigador y sus colaboradores, y las instalaciones y medios disponibles, tal y como ha sido informado, son apropiados para llevar a cabo el estudio.
- Además, el citado CEIC cumple las normas de BPC (CPMP / ICH / 135 / 95).

Este CEIC acepta que dicho estudio sea realizado por el investigador principal:

Dr. Francisco Javier Narbona Cárceles / Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología / H. G. U. Gregorio Marañón

Lo que firmo en Madrid, a 01 de junio de 2009

  
**Fdo: Dr. Fernando Díaz Otero**

|       |             |       |
|-------|-------------|-------|
| N.E.: | C.I.: 94/09 | C.P.: |
|-------|-------------|-------|

C/ Dr. Esquerdo 46, Pabellón de Gobierno, Planta baja, 28007 Madrid  
[ceic.hgugm@salud.madrid.org](mailto:ceic.hgugm@salud.madrid.org) Tel. 91-586 70 07 – Fax. 91-400 81 56

## 8.2 MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO



### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL ASPIRADO DE MÉDULA ÓSEA DE CRESTA ILÍACA, METÁFISIS DISTAL DE FÉMUR Y METÁFISIS PROXIMAL DE TIBIA.

Seguro que usted ha tenido conocimiento de los avances tecnológicos en el campo de la Terapia Celular y la Medicina Regenerativa. La experimentación con células madre ofrece nuevas oportunidades para el tratamiento y curación de enfermedades complejas. Para avanzar en el conocimiento de la biología de estos tipos celulares, así como las técnicas empleadas en su procesamiento, es muy importante el poder estudiar muestras de tejidos sanos. Uno de los tejidos más ricos en células madre y más utilizados por su fácil acceso es la Médula Ósea. Este tejido se encuentra en la epífisis de huesos planos en el adulto: cresta iliaca, esternón, etc..

Usted va a ser sometido a la siguiente intervención: Prótesis Total de Rodilla. La anestesia a la que estará sometido nos permitiría tomar una muestra de médula ósea, mediante aspirado en cresta iliaca (hueso plano de la cadera), de cantidad inferior a 15 ml de sangre sin que ello modifique la técnica quirúrgica ni el protocolo de intervención. En el caso de que usted sintiese alguna molestia se le aplicaría anestesia local. La punción se realiza en la cresta ilíaca con un trocar fino (aguja fina de aspirado/punción medular). En este caso los riesgos incluyen: Infección del punto de entrada, hematoma o cardenal pasajero, perforación de víscera hueca, dolor en el punto de extracción. Así mismo se tomarán muestras similares de las zonas de hueso de tibia y fémur donde le va a ser implantada la prótesis, sin que se modifique la técnica quirúrgica de ésta.

Sería de gran utilidad que usted nos autorizase a realizarle una punción/aspiración de médula ósea a nivel de la cresta ilíaca y de los huesos de la rodilla (metáfisis distal de fémur y metáfisis proximal de tibia). La donación del aspirado es totalmente voluntaria y en ningún caso se le realizará si no da su consentimiento. Esta donación no tiene beneficio propio para usted únicamente su apoyo a la investigación, dado que la importancia de este tipo de estudios es crucial para el avance de la Medicina.

**Por tanto, le proponemos que nos permita aprovechar su intervención quirúrgica (Prótesis Total de Rodilla) y el tipo de anestesia que ésta conlleva (Generalmente epidural) para realizar el procedimiento antes descrito (Punción aspiración de médula ósea en cresta ilíaca, metáfisis distal de fémur y proximal de tibia).**

Le garantizamos que el material se tratará con la mayor confidencialidad y los datos del donante se mantendrán bajo la más estricta confidencialidad y anonimato, según dispone la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal.

La única finalidad de esta prueba es obtener material para investigación y en todo momento nos ajustaremos a la legislación vigente sobre la materia. Dicho material se recogerá en las condiciones adecuadas y se usará únicamente para investigación. En ningún caso se dará uso comercial a éste material.

La donación de éste material es voluntaria y altruista, y usted estaría colaborando en el avance de la investigación biomédica.

**Declaración del donante:**

Se me ha facilitado esta hoja informativa, habiendo comprendido el significado del procedimiento y los riesgos inherentes al mismo, y declaro estar debidamente informado/a, según disponen los artículos 8,9 y 10 de la Ley 41/2002, del 14 de Noviembre, Básica reguladora de la autonomía del paciente y de Derechos y Obligaciones en materia de Información y Documentación Clínica, habiendo tenido oportunidad de aclarar mis dudas y habiendo recibido respuesta a todas mis preguntas y tomado la decisión de manera libre y voluntaria.



- He sido informado por el Dr. \_\_\_\_\_ del procedimiento de aspirado de médula ósea a nivel de cresta ilíaca, fémur y tibia realizado en el contexto de una cirugía de prótesis total de rodilla..
- He comprendido la información recibida y he podido formular todas las preguntas que he creído oportunas
- **Autorizo a que se me realice aspirado** de médula ósea a nivel de cresta ilíaca, fémur y tibia de la zona de la rodilla durante la cirugía en la que se me va a implantar una prótesis total de rodilla.

**Nombre:** \_\_\_\_\_

**Madrid a** \_\_\_\_\_ **de** \_\_\_\_\_ **del año** \_\_\_\_\_

**Firma del donante**

**Firma del médico que informa**

\_\_\_\_\_

**Revocación/Denegación de consentimiento informado.**

Yo, D/Dña. \_\_\_\_\_ después de ser informado/a de la naturaleza y riesgos del procedimiento propuesto, manifiesto de manera libre y consciente mi denegación o revocación para su realización.

**Madrid a** \_\_\_\_\_ **de** \_\_\_\_\_ **del año** \_\_\_\_\_

**Firma del donante**

CONTACTO. Servicio de Traumatología del Hospital Gregorio Marañón. Dr. Fco. Javier Vaquero Martín, Jefe de Servicio: Teléfono: 91 586 8426/8427



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA  
DICIEMBRE 2012